

T
513

90881



Casa abierta al tiempo

**TOXICIDAD A BAJAS DOSIS DE PLOMO EN CEREBRO, PLACENTA Y
CORDÓN UMBILICAL DE RATAS EN DESARROLLO; EVALUACIÓN
HISTOPATOLÓGICA, ULTRAESTRUCTURAL Y NEUROQUIMICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

M. en C. JUANA VILLEDA HERNANDEZ

ENERO - 2003

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia de CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

**El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó que la tesis que presentó**

Juana Villeda Hernández

El día 9 de Enero del 2003

Comité Tutorial:

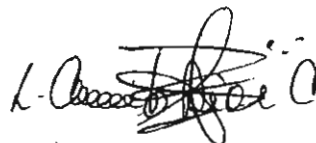
Tutor: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Asesor: Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz

Asesor: Dr. Rogelio Hernández Pando

Sinodal: Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Sinodal: Dr. Luis Felipe Jiménez García

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'L. Camilo Ríos Castañeda', with a stylized flourish at the end.

Este trabajo se realizó en Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía“ Manuel Velasco Suárez” en la Unidad de Investigaciones del Sistema Nervioso en:

El Laboratorio de Neuromorfología Celular

El Departamento de Neuroquímica

El Departamento de Patología

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el No. de Registro 119033/120845

*Es fundamental encaminar nuestras
Actividades privilegiando siempre la vocación,
Elegiendo lo que nos gusta, lo que queremos ser,
Y no aceptando pasivamente lo que otros
pretenden que seamos. A veces no es fácil,
y tenemos que pelear para poder ser nosotros
mismos. Pero vale la pena, el premio es inmenso
y deja fuerte sabor a la libertad.*

Antonio Mateo Allende.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Camilo Ríos por su apoyo y consejos para adiestrarme en el conocimiento de la ciencia.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones y el tiempo dedicado para el desarrollo y culminación del trabajo de tesis:

**Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz
Dr. Rogelio Hernández Pando
Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Dr. Luis Felipe Jiménez García**

A la Dra. Barroso por los primeros consejos y enseñanzas en este inmenso e infinito camino científico.

A Marisela por su apoyo, ayuda, pero sobre todo su amistad incondicional que me ha demostrado en todo momento.

A Laurita, Lupita y Sonia por sus valiosos comentarios y su apoyo tanto en lo académico como en lo técnico. Y por su gran amistad.

A Conchita por su apoyo en parte del trabajo

A Minerva por su amistad y por compartir las nuevas experiencias

A Jorge por todo su apoyo y sus sabios consejos.

A todas las personas que de una u otra manera hicieron posible la culminación de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres Fily y Flora por su apoyo incondicional en todo momento, por la confianza, amor y comprensión que siempre me han brindado.

Con profundo amor a Simón por compartir mis trabajos, mis angustias y mi felicidad, y por su apoyo en al culminación de este trabajo.

A mis Hermanos: Matha, Lourdes, Celia, Susy, Fily, Ma. De Jesús por su cariño, paciencia y comprensión.

A Florisel como un ejemplo para su superación personal

A mis sobrinos: Kren, Itsel, Marco A. Tania, Daniel, Vania, Alejandro, Ricardo y Valeria que lo consideren como una motivación para que sean verdaderos hombres realizados.

A toda mi familia, Cuñados, Tíos, Primos, sobrinos, porque de cada uno he tenido cariño y afecto.

A todos mis amigos y compañeros por su cariño.

RESUMEN

La neurotoxicidad por la exposición a plomo (Pb) puede ser el resultado de una serie de pequeñas alteraciones en el metabolismo del cerebro, en donde el estrés oxidativo también juega un papel importante. Algunos estudios indican que la intoxicación prolongada con Pb induce un incremento en la peroxidación de lípidos como un posible mecanismo de algunos efectos patofisiológicos. La toxicidad del Pb es más evidente en los niños, por la inmadurez de la barrera hematoencefálica. En este trabajo se analizó la concentración de Pb y los productos fluorescentes lipídicos (LFP) como un índice de peroxidación de lípidos en corteza parietal (CX), Estriado (E), hipocampo (H), tálamo (T) y cerebelo (Ce), placenta y cordón umbilical, de animales en desarrollo expuestos a Pb, en un grupo de ratas de 45 días de edad. También se analizó el Pb en sangre, se hizo análisis histopatológico por microscopía óptica y electrónica y localización inmunohistoquímica de la proteína glial fibrilar (GFAP) de todas las regiones ya mencionadas. Se utilizaron 10 ratas gestantes como controles y su tratamiento fue con agua desionizada. Veinte ratas Wistar gestantes fueron intoxicadas con acetato de Pb en la bebida (10 a una concentración de 160 ppm y 10 a 320 ppm) 5 ratas gestantes de cada grupo fueron sacrificadas a los 21 días de gestación, se obtuvieron 10 fetos, se les disectó el cerebro para determinar los niveles de Pb, peroxidación de lípidos (LFP) a otros 5 se les proceso para el estudio histopatológico y de microscopía electrónica. Así mismo se obtuvieron las placentas y cordones umbilicales de estas crías. Los animales restantes de cada grupo se dejaron hasta 45 días de edad. Se sacrificaron y se disectaron los cerebros para el estudio histopatológico y bioquímico de las mismas regiones ya mencionadas. Los resultados muestran que los niveles de Pb en sangre se incrementaron de manera dosis-dependiente. Hay también un incremento de los niveles de Pb en el grupo de 21 días de gestación en E, T, Cx, placenta y cordón umbilical y los LFP aumentaron significativamente ($P < 0.01$) en E, Ce, Cx, placenta y cordón umbilical, con respecto al control. En el grupo de 45 días de edad se vio una acumulación preferencial de los niveles de Pb en Cx, E y T. Los LFP se incrementaron en E, T, y Hc con una diferencia estadísticamente con respecto al control. Los resultados histopatológicos por microscopía de luz muestran células con vacuolización citoplásmica e hipercromáticas, cromatólisis y retracción, algunas tienen núcleos condensados, y otras presentaron desintegración de la cromatina y edema intersticial en todas las regiones estudiadas, en placenta se observó una severa congestión vascular, células con vacuolización citoplásmica y muchas con desintegración de la cromatina y edema intersticial, en cordón umbilical hubo células hipercromáticas con edema intersticial. La localización inmunohistoquímica de la GFAP fue evidente en todos los grupos de 21 días de gestación. En los grupos de 45 días de edad, hubo mayor inmunoreactividad inducida por Pb en Cx, H, y Ce con severo daño en las células de Purkinje. Los resultados por microscopía electrónica mostraron núcleos con cuerpos densos, cromatina marginal y edema intra e intercelular en neuronas, en células endoteliales fue evidente solo edema extracelular, en las mitocondrias no se observaron grandes cambios. Estos datos indican que el Pb tiene efectos tóxicos en ratas en desarrollo expuestas a bajas dosis de acetato de Pb y produce efectos neurotóxicos con una correlación compleja con el contenido de Pb regional y la peroxidación de lípidos.

ABSTRACT

The neurotoxicity associated to lead (Pb) exposure may be the result of a series of small perturbations in the brain metabolism among them, of oxidative stress. Some studies have suggested a lead-induced enhancement in lipid peroxidation as a possible mechanism for some toxic effects of lead that can result in a cascade of pathophysiological effects observed. Pb toxicity is more evident in the children than in adults as a result of the immaturity of blood-brain barrier. In This work, we have determined the concentration of lead and the lipid fluorescence products in the blood, parietal cortex (Cx), striatum (S), hippocampus (Hp), thalamus (T) and cerebellum (Ce), were also studied optical and electron microscopically the effect of lead. Twenty pregnant Wistar rats were intoxicated with lead solution containing either to 160 (ten gestant rats) and 320 (ten gestant rats) ppm in the drink. Five pregnant rats were killed of each group, on gestation day 21 and fetuses were obtained for studying the concentration of lead, the lipid fluorescent products (LFP), histopathologic examination by optic and electron microscopic, and the immunohistological localization of glial fibrillar acidic protein (GFAP) in the brain regions, (Cx, S, Hc, T and Ce), we also studied the placental and umbilical cord. The pups of the remaining rats were treated after birth in the same way until 45 days of age they. Were killed at postnatal day 45 of each group, and lead level was assessed biochemical in blood and different brain regions and for histopathological examination also. Ten pregnant rats of the control group received desionized water and were killed for the same periods. The results showed that blood lead levels were increased in a dose-dependent maner. Lead levels were increased in gestation day 21 in S, T and Cx, and S, Ce, Cx, LFP significantly ($p < 0.01$). In the group of day 45 the Cx, S, and T a showed preferential accumulation of lead and lipids fluorescence products in S, T and Hc, statistical significance from control group. All brains regions showed shrunken, cytoplasmic vacuolization and hiperchromatic cells and condensed nuclei with chromatolysis and kariorrhesis and interstitial edema, the placental showed severe vascular congestion, cells with cytoplasmic vacuolization and a lot of them showed abnormal chromatin and edema, the umbilical cord hyperchromatic cells were observed with severe interstitial edema. Immunohistochemical localization of GFAP was evident in all regions of the group of gestation day 21. In the groups of day 45 were more evident in Cx, Hc, and Ce with severe damage of the Purkinje cells. The ultrastructural studied in neurons showed body dense in the nucleus, marginal chromatin and intra e intercellular edema, in endothelial cells is evident edema only. In the mitochondria no changes were observed. These data suggest lead have a toxic effects in developing rat exposed to low-levels of lead acetate and produce a neurotoxic effects with a complex correlation in both lead regional content and lipid peroxidation.

INDICE

<i>Resumen</i>	I
<i>Abstract</i>	II
I.- Antecedentes	
1.1 Generalidades del Plomo	1
1.2 Propiedades Fisicoquímicas	3
1.3 Fuentes de Exposición del Plomo y sus Usos.	3
1.4 Metabolismo del Plomo.	6
II.- Toxicidad Sistémica del Plomo	
2.1 Sistema Hematopoyetico	15
2.2 Sistema Nervioso Central	17
2.3 Efectos Gastrointestinales	19
2.4 Efectos Neuromusculares	19
2.5 Efectos Renales	20
2.6 Efectos Histopatológicos	20
2.7 Efectos Genotóxicos	22
III.- Mecanismos Bioquímicos y Moleculares del Plomo..	
3.1 Plomo y los Neurotransmisores	24
3.2 Plomo y el Metabolismo del Calcio.	26
3.3 Radicales Libres	29
3.4 Los Radicales Libres más Comunes	33
3.5 Mecanismos de Toxicidad	34
3.6 Sistemas de Defensa Antioxidantes.	36
3.7 El Plomo y sus Efectos en la Proteína Glial Fibrilar (GFAP)	41
IV.- Objetivos.	42
V.- Material y Método	45
5.1 Animales	46
5.2 Tratamientos	46
Métodos	
5.3 Determinación del Plomo	
5.3.1 Sangre.	48
5.3.2 Regiones Cerebrales, Placenta Y Cordón Umbilical.	49

5.4 Determinación de la Peroxidación de Lípidos

5.4.1 Sangre	50
5.4.2 Placenta y Cordón Umbilical	51
5.4.3 Regiones Cerebrales	51
5.4.4 Determinación de Proteínas	52
5.5 Estudio Histopatológico	52
5.6 Análisis por Microscopía Electrónica	53
5.7 Análisis Inmunohistoquímico	54
5.8. Análisis Morfométrico	55
5.8 Análisis Estadístico	56

VI.- Resultados

6.- Resultados Bioquímicos

Hipótesis I	57
--------------------	-----------

6.1 Determinación de Plomo

6.1.1 Sangre	59
6.1.2 Placenta y Cordón Umbilical	61
6.1.3 Regiones Cerebrales	63

6.2 Determinación de la Peroxidación de Lípidos

6.2.1 Sangre	67
6.2.2 Placenta y Cordón Umbilical	69
6.2.3 Regiones Cerebrales	71

6.3 Resultados Morfológicos	75
6.3. Análisis por Microscopía Electrónica	78
6.4 Resultados Inmunohistoquímicos	80
6.5 Resultados Morfométricos	83

VII.- Discusión	107
----------------------------------	------------

VIII.- Conclusiones	117
--------------------------------------	------------

IX.- Referencias	120
-----------------------------------	------------

I. ANTECEDENTES

1.1 GENERALIDADES DEL PLOMO

Desde 1862 ya se observaban problemas por contaminación con Pb y sus efectos adversos sobre la salud en México (Cooper, 1980). Sin embargo hasta hace unas décadas solamente se han llevado a cabo estudios sobre Pb en el ambiente en México, muchos de los cuales se han enfocado a la determinación de Pb en el ambiente en diferentes medios y a muestras biológicas de trabajadores y sus familias expuestas. Por lo tanto la información disponible es dispersa y con muchas discrepancias en los resultados y difícil de interpretar. Aún en la actualidad es escasa la información sobre los niveles de Pb en sangre y sus determinantes en la población mexicana (Albert y col., 1991; SEMARNAP, 1997).

El Pb no es un elemento esencial para la actividad normal de los sistemas biológicos, se encuentra distribuido en forma natural en la corteza terrestre en una concentración de 16 mg/kg y es purificado industrialmente a partir de la galena (PbS), la cerusita (PbCO₃) y la anglesita (PbSO₄). El metal se obtiene principalmente por fundición del mineral y anualmente se producen 3.3 x 10⁶ toneladas de Pb en todo el mundo, el 14% de este total corresponde a América Latina, siendo los principales productores Perú (212,600 toneladas / año) y México (184,261 toneladas / año) (Galvao y Corey, 1989).

El Pb se encuentra en algunas tuberías, lugares donde se almacenan baterías, los aditivos que se utilizan en las gasolinas, la cerámica vidriada con Pb a bajas temperaturas, los plásticos, los dispositivos electrónicos, las soldaduras y las pinturas [Romieu y col 1995, Mitchell y col,1990 y Farias y col, 1996]. El Pb atmosférico existe en forma sólida, como polvo o partículas de dióxido de Pb, o en forma de vapor particularmente plomo formado por la evaporación.

El Pb es utilizado ampliamente en fábricas de acumuladores eléctricos, fábricas de pinturas (como óxido de plomo) y fundidoras de Pb (SEMARNAP, 1997).

1.2 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

El plomo (Pb) es un metal gris plateado, muy brillante recién extraído, que se va oscureciendo al contacto con el aire, es el más blando de todos los metales pesados, es detectable prácticamente en todas las fases del ambiente inerte y en todos los sistemas biológicos [SEMARNAP 1997], con un peso atómico de 207.21, número atómico de 82, valencias 2, 4, en la naturaleza existen tres isótopos: ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb . Su punto de fusión es de 327°C y de ebullición de 1620°C ; forma compuestos tetravalentes y divalentes predominando estos últimos. También existe en una amplia variedad de compuestos orgánicos, entre los más comúnmente usados se encuentran el tetrametilo de plomo y el tetraetilo de plomo [Keogh, 1992].

1.3 FUENTES DE EXPOSICIÓN DEL PLOMO Y USOS

El Pb es un metal que por sus propiedades fisicoquímicas ha sido utilizado ampliamente por el hombre a través del tiempo. Las principales fuentes de exposición al Pb se encuentran en el ambiente ocupacional y en el ambiente general. A las fuentes de contaminación ocupacional pertenecen los procesos de industrialización (fundición y refinación) del Pb, los cuales emiten cantidades importantes de este metal al medio ambiente (O.M.S., 1995) y las actividades de minería. Es importante mencionar que los procesos de fundición del metal presentan mayor riesgo para la salud de los trabajadores, ya que durante esta actividad el Pb calentado desprende vapores con partículas con un diámetro menor a $5\ \mu\text{m}$, lo que hace posible que al ser inhaladas se depositen en las vías respiratorias [Galvao y Corey, 1989; Romieu y col, 1994].

Las principales fuentes de contaminación en el ambiente general son las mismas que las de la contaminación ocupacional y los procesos de la combustión de la gasolina. Estos liberan a la atmósfera partículas finas de hidrocarburos, haluros, óxidos y carbonatos de Pb [Fuentes-Aguilar y col. 1993] las cuales dependiendo de su tamaño pueden penetrar fácilmente al aparato respiratorio y ser absorbidas por el organismo. Los valores permisibles por la norma Mexicana para el Pb atmosférico son de 1.5 mg/m^3 , aunque en ciudades con gran actividad industrial y vehicular como el D.F., las concentraciones de Pb en el medio ambiente han llegado a ser mayores a las permisibles [Avediz, 1984, Romieu y col, 1994].

La contaminación de alimentos con Pb la producen los objetos de cocina, en México se utiliza comúnmente el vidriado con plomo para cubrir utensilios de cerámica para cocinar, almacenar y servir agua y alimentos. Esta loza tradicional se endurece a relativamente bajas temperaturas, por lo cual el Pb permanece en el vidrio y puede ser liberado en la comida o bebida, especialmente si estos son ácidos [Rothemberg y col, 1990, Hernández y col, 1991 y Farias y col. 1996].

En el agua, la exposición al Pb es mínima, ya que forma compuestos insolubles como carbonatos y sulfatos [Galvao y Corey, 1989].

Los alimentos también pueden contaminarse con Pb antes de ser procesados. Se ha observado un alto contenido de plomo en vegetales cultivados en jardines urbanos, cuando la tierra contiene un alto porcentaje de Pb en el aire o en el agua con que se irrigan (WHO, 1992). Un estudio en Tula Hidalgo mostró un considerable contenido de Pb en vegetales regados con aguas residuales presentaron un rango de 0.14-3.74 mg/kg (Romieu y col, 1994).

Los cigarrillos, son otra fuente potencial de exposición a Pb, el contenido de Pb encontrado en cigarrillos mexicanos es de 0.91-41.690 mg/kg, estos resultados nos indican que fumar es un factor riesgo de exposición al plomo (Romieu col, 1994).

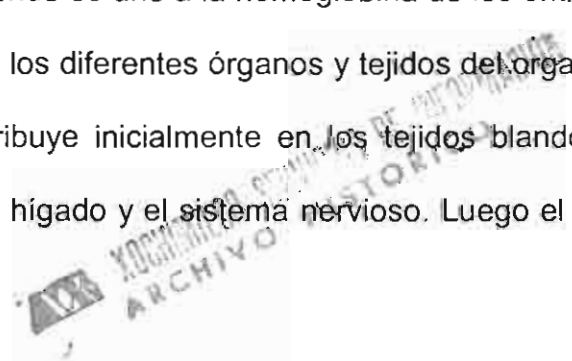
Otras fuentes de exposición a Pb en concentraciones variables en el ambiente general las constituyen los suelos, el tabaco, las pinturas de las paredes de las casas, sobre todo en los niños [Galvao y Corey, 1989; Parry y col, 1991]. Algunos cosméticos, tales como los delineadores o sombras para párpados contienen Pb y pueden ser una fuente de exposición al Pb si se usan con frecuencia [Parry y col, 1991].

1.4 TOXICOCINETICA DEL PLOMO

Las vías principales de absorción del Pb son el tracto gastrointestinal y el sistema respiratorio. El grado de absorción depende de varios factores entre los que se encuentran: el tamaño de las partículas, la forma química, la solubilidad, el estado nutricional y la edad del sujeto expuesto [Conrad y Barton, 1978; Schweinsberg y col, 1990]. Se estima que la ingesta diaria de Pb en la población no ocupacionalmente expuesta varía de 20 a 400 µg diarios [WHO,1989] y la absorción intestinal de Pb es mayor en los niños (principalmente lactantes) que en los adultos [Chilson col, 1974; Klassen, 1996].

La absorción gastrointestinal en los adultos es alrededor del 10% del Pb ingerido, mientras que los niños absorben hasta un 40%. La absorción del metal inhalado depende de las concentraciones o volumen de aire respirado por día y la forma (vapor o partículas). Se puede absorber alrededor del 90% del Pb inhalado del aire ambiental [Goyer, 1985; Klassen, 1996]. Una vez que el Pb es inhalado a través del tracto respiratorio, parte de las partículas inhaladas pasan al esófago y se absorben parcialmente (10-15%) en el aparato gastrointestinal.

Las partículas depositadas en los alvéolos pulmonares restantes, se absorben y pasan al torrente sanguíneo, en donde se une a la hemoglobina de los eritrocitos para ser transportado y distribuido a los diferentes órganos y tejidos del organismo [Schweinsberg col, 1990], se distribuye inicialmente en los tejidos blandos, en particular el epitelio tubular renal, el hígado y el sistema nervioso. Luego el plomo



es redistribuido y depositado en hueso, dientes y pelo [Cassarett, 1991]. Con el tiempo, en el hueso se encuentra cerca del 95% de la carga corporal del metal. Sólo pequeñas cantidades de plomo inorgánico se acumulan en el cerebro, la mayor parte en la sustancia gris y en los ganglios basales [Task, 1973; Cassarett, 1991].

La absorción de plomo puede incrementarse con dietas pobres en calcio, hierro y/o proteínas [Barton y col, 1978]. Sólo el Pb orgánico (tetraetilo) es absorbido a través de la piel pero puede ser una vía significativa en trabajadores expuestos que no tengan protección adecuada [Graff, 1989;].

Los compuestos orgánicos como el tetrametilo y tetraetilo de Pb se acumulan preferentemente en el hígado. El Pb es eliminado del organismo principalmente por dos vías: por heces y por orina; también es excretado en la leche materna. La vida media del Pb en el organismo en general es larga y depende del tejido donde se haya depositado en sangre por ejemplo es de 28 días [Galvao y Corey, 1989; Schweinsberg y col, 1990].

II. TOXICIDAD SISTEMICA DEL PLOMO

El Pb es un agente tóxico que se acumula progresivamente en el organismo ocasionando daño en diferentes órganos y sistemas, produciendo así una variedad de signos y síntomas que dependen del tipo de intoxicación observada. La intoxicación por Pb en adultos comunmente es ocupacional (Claudio y col. 1997). Los niños de corta edad se intoxican a menudo al mordisquear los fragmentos de pintura dulzones [Davis y col,1990; Goyer 1993].

Las intoxicaciones agudas son raras y son consecuencia de la ingestión de compuestos solubles en ácido o inhalación de vapores del mineral. Los efectos locales en la boca incluyen notable astringencia, sed y regusto metálico, después surge nausea, dolor abdominal y vómito [Graff, 1989]. Este último puede ser de aspecto lácteo, por la presencia de cloruro de Pb, el excremento puede tener color negro por el sulfuro de plomo y a veces hay diarrea o estreñimiento si se absorben rápidamente grandes cantidades de Pb puede surgir un síndrome de choque, a consecuencia de la pérdida masiva de líquidos en vías gastrointestinales [Klassen, 1996]. Entre los síntomas agudos del sistema nervioso central están; parestesias, dolor y debilidad muscular. A veces se observa una crisis hemolítica aguda, que causa anemia. El Pb daña los riñones y se advierten oliguria y cambios en la orina [Klassen, 1996]. y se producen en ambientes laborales y en niños; las intoxicaciones crónicas son más frecuentes y constituyen un problema epidemiológico de gran importancia [Klassen, 1996].

La intoxicación crónica (saturnismo o plumbismo) se pueden dividir en varias categorías de síntomas: gastrointestinales, neuromusculares, del sistema nervioso central, hematológicos, renales y de otra índole. Por lo general las alteraciones neuromusculares y del sistema nervioso central resultan de la exposición intensa, mientras que el abdominal es una manifestación más común de una intoxicación de desarrollo muy lento e insidioso. Las alteraciones del sistema nervioso suelen ser más frecuentes entre los niños, mientras que el gastrointestinal prevalece en los adultos [Klassen, 1996].

La placenta es un órgano accesible por el cual el Pb puede atravesar de la madre al feto desde las primeras semanas de la gestación (Chang y col, 1980; Antonio et al, 1996), produciendo aproximadamente iguales concentraciones de Pb en la sangre materna y el cordón umbilical. Esto conlleva a un incremento de los niveles de Pb en la sangre del feto [Chang y col, 1980].

La alta sensibilidad del feto a los efectos tóxicos de Pb se debe a la inmadurez de la barrera hematoencefálica [Bradbury y col, 1993] y la susceptibilidad del desarrollo del sistema nervioso durante la modificación y estructura prematura del circuito neuronal [Douglas col, 1991; Franklin y col 1997], la capacidad del Pb para competir con el Ca^{2+} y activar las proteínas cinasas pueden alterar la conducta de las células endoteliales en el cerebro inmaduro y altera la barrera, el efecto del Pb es directo sobre las células endoteliales aunque actúa indirectamente en los microvasos por el daño a los astrocitos que proporcionan señales para mantener

la integridad de la barrera hematoencefálica [Bressler y col, 1991]. Estudios hechos por auto radiografía muestran que el Pb atraviesa la barrera hematoencefálica a través de las prolongaciones de los astrocitos y el espacio perivascular [Sündstrom y col, 1985], por lo tanto el Pb en el sistema nervioso central en desarrollo puede causar alteraciones en la función de la barrera hematoencefálica, con la presencia de pequeñas lesiones hemorrágicas con daño focal de los vasos como eventos cruciales en la patogénesis de encefalopatía de ratas lactantes [Sündstrom y col. 1985].

Es posible que los efectos del Pb en las funciones del cerebro podrían reflejar efectos indirectos mediados por la alteración en las acciones de componentes regulatorios endógenos como son las citocinas, ya que estas tienen que atravesar la barrera hematoencefálica y juegan un papel muy importante en el sistema nervioso central y el sistema inmune [Dyatlov y col, 1998]. Recientes estudios indican que hay una posible interacción entre el Pb y las citocinas aunque es sabido que no altera la barrera hematoencefálica a concentraciones usualmente encontradas en humanos adultos. Sin embargo, hay reportes que indican que algunas citocinas incluyendo la ínter leucina-2 y ínter leucina-6 pueden alterar la barrera e incrementar la permeabilidad de las células endoteliales [Dyatlov y col, 1998].

Evidencias experimentales indican que el cerebro fetal tiene una gran sensibilidad al Pb [Goyer y col, 1993] y es particularmente vulnerable a la exposición de ciertos metales durante la gestación que pueden provocar

anormalidades en el feto, como abortos espontáneos, pérdida fetal y neonatal en humanos y efectos embrio y fetotóxicos en animales experimentales [Singh y col, 1993], malformaciones esqueléticas retardando el crecimiento [Hamilton y col, 1994], también se reporta retardo en la migración neuronal y espinas dendríticas causando retraso mental, la exposición puede ser a través de la madre [Douglas col, 1991]. Hay evidencias que muestran que los animales jóvenes desarrollan encefalopatía durante los primeros días de vida y la neurotoxicidad inducida por el Pb se produce después de los 18-20 días de edad [Goyer y col, 1993] Los efectos neurotóxicos del Pb en adultos y en niños son diferentes. En los niños la neurotoxicidad del Pb es principalmente en sistema nervioso central en gran parte por la falta de madurez de la barrera hematoencefálica la cual permite el paso del Pb hacia el encéfalo.

La intoxicación por plomo en los niños es el resultado frecuente de la ingestión de fragmentos de pinturas de edificios viejos, de los interiores y exteriores de las viviendas que se pintaron con materiales hechos de carbonato y óxido de plomo, en las pinturas de este tipo de Pb pueden constituir de 5-40% de sólidos secos. Se han observado síntomas clínicos en niños que van desde ataxia hasta el coma y convulsiones que pueden en ocasiones ser fatales, los niños que sobreviven a esto pueden tener retraso mental, convulsiones y ataques epileptiformes cuando las concentraciones en la sangre llegan hasta 80 $\mu\text{g}/\text{dl}$ o más [Goyer y col, 1993] se ve afectado su coeficiente intelectual cuando están expuestos a bajas concentraciones, observándose también retraso en el proceso de aprendizaje y memoria [Davis col, 1990; Goyer y col, 1993]. Los menores con concentraciones

de plomo en sangre mayores de 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ están en peligro de mostrar discapacidades en su crecimiento, en los adultos con valores menores de 30 $\mu\text{g}/\text{dl}$ no se presentan lesiones funcionales, ni síntomas manifiestos, sin embargo pueden tener una disminución neta en la actividad de deshidratasa de δ -ALA (Fig. 2 y 3). Hay un incremento leve en la excreción de δ -ALA por la orina y un aumento en la porfirina eritrocítica [Klassen, 1996].

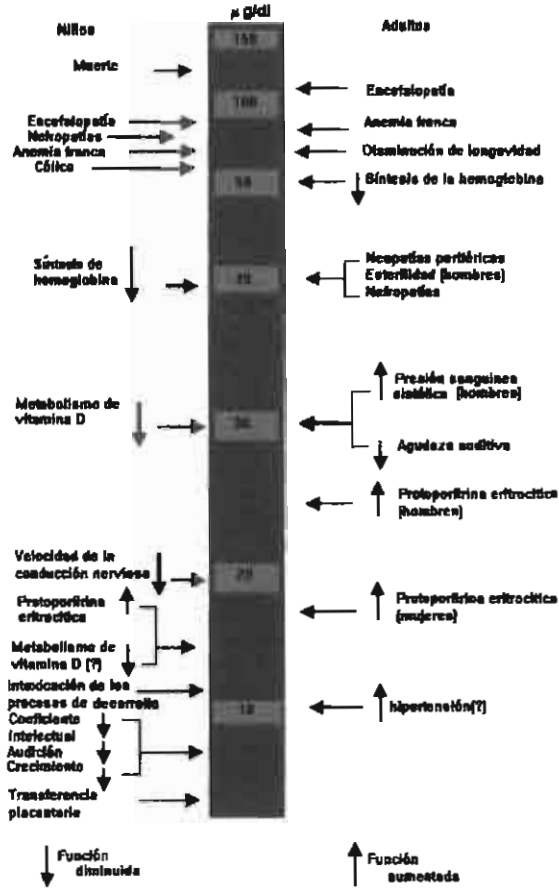


Figura 2. Muestra las manifestaciones de la intoxicación por plomo, en relación con las diversas concentraciones del metal en la sangre de niños y adultos (Tomado de Klassen , 1998).

Los individuos con concentración de Pb en sangre de 30 a 75 µg/dl, tienen todas las anomalías de laboratorio mencionadas y por lo común síntomas leves e inespecíficos de intoxicación por Pb [Klassen, 1996].

Las manifestaciones netas del plumbismo surgen con concentraciones que rebasan los 75 µg/dl en sangre completa [Keogh, 1961a, 1961b] y la encefalopatía saturnina suele surgir cuando las concentraciones del metal son mayores de 100 µg/dl. La mayoría de los sujetos con intoxicación por Pb tienen concentraciones del metal en orina de 150 a 300 µg/dl. Sin embargo entre quienes tienen nefropatía crónica por Pb u otras formas de insuficiencia renal, la excreción del Pb en la orina puede estar dentro de los límites normales a pesar de haber un aumento considerable de las concentraciones del metal en sangre [Keogh, 1961a, 1961b].

En los adultos principalmente afecta el sistema hematopoyético, el sistema neuromuscular y el sistema nervioso periférico, se ha observado que el sistema nervioso central es afectado con altas dosis provocando irritabilidad, fatiga, depresión y dolor de cabeza [Davis col, 1990] además de anomalías en coordinación, visual-motor, control motor y motor fino, esto se ha observado en trabajadores que han sido expuestos a Pb y tienen en sangre niveles hasta de 40 µg/dl de Pb ó más [Graff, 1989;Goldstein, 1992].

2.1 Sistema Hematopoyetico

Uno de los sistemas más sensibles a la toxicidad del Pb es el sistema hematológico, el Pb induce cambios en la composición de las proteínas de membrana de los eritrocitos, reduce la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ e inhibe la síntesis de hemoglobina, sin embargo el mecanismo responsable de los efectos tóxicos del Pb en los eritrocitos no es completamente claro [Gürer, 1998].

Cuando las concentraciones de Pb en sangre se acercan a los 80 $\mu\text{g}/\text{dl}$ se observa en los eritrocitos un moteado basófilo [agregación de ácido ribonucleico], lo cual se considera un efecto inhibitor del Pb sobre la enzima pirimidina-5'-nucleotidasa, se produce anemia microcítica hipocrómica misma que, se observa con más frecuencia en los niños, y guarda una semejanza morfológica con la anemia por deficiencia de hierro, y se cree que se produce por dos factores; por una disminución en la vida de los eritrocitos y una inhibición de la síntesis del grupo hemo [Klassen, 1996].

La síntesis del hemo es alterada por concentraciones pequeñísimas de Pb, el metal inhibe la formación del hemo en varios puntos como se muestra en la figura 3. Se ha corroborado minuciosamente la inhibición de la dehidratasa y la ferroquelatasa, la δ -aminolevulinato (δ -ALA) enzimas que dependen de sulfhidrilo. En la intoxicación por Pb en humanos y en animales de experimentación se caracteriza por la acumulación de la protoporfirina IX y hierro no-hemo en

eritrocitos, por acumulación de δ aminolevulinico-ALA, y por una mayor excreción de esta última y de la coproporfirina III en la orina. El incremento en la actividad de la sintetasa de δ -ALA se debe a la disminución de la concentración celular de hemo que regula la síntesis de dicha enzima por inhibición retroactiva [Klassen,1996].

El Pb interfiere en la síntesis de globulina en los eritrocitos, causando concentraciones muy elevadas de sus precursores en sangre y orina así como anemia de tipo hipocrómica microcítica [Strand y col. 1972; Tomokuni y col, 1990; Rossi y col. 1990; Ming y col, 1990].

En los exámenes del laboratorio, la evaluación de la actividad disminuida de la enzima ALA-D, el aumento de las coproporfirinas urinarias, el aumento del ácido delta aminolevulinico y el aumento de la protoporfirina IX, son patognomónicas de la intoxicación por Pb, diferenciándola de otras alteraciones genéticas de las porfirinas [Hisao y col, 1981, Klassen1996].

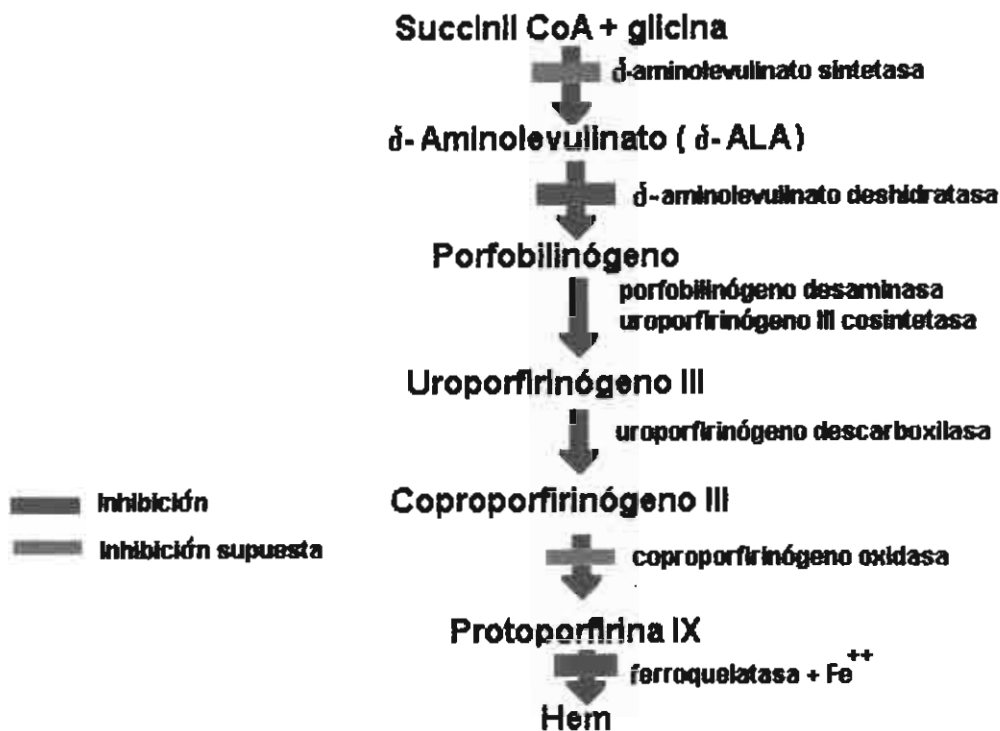


Figura 3. El plomo inhibe la biosíntesis del hemo en diversas etapas enzimáticas. Las etapas inhibidas definitivamente por el plomo están señaladas por una banda angosta azul. Aquellas en que parece actuar sin que haya pruebas concluyentes, están indicadas con una banda azul claro. (Tomado de Klassen, 1996)

2.2 Sistema Nervioso Central

El síndrome del SNC se ha denominado encefalopatía saturnina ó por Pb. Es la manifestación más grave de esta intoxicación y mucho más frecuente en niños que en adultos. En ocasiones la exposición a Pb ocasiona un deterioro psíquico definido y pre-agresivo en niños con una evolución de los primeros 12-18 meses

de vida, seguido de una pérdida implacable de sus capacidades motoras y del habla, pueden mostrar hipercinesia intensa y conducta agresiva, y un cuadro convulsivo de difícil control [Klassen, 1996].

La falta de percepción sensorial impide gravemente el aprendizaje cuando las concentraciones de plomo rebasan los 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$ en sangre completa. Los niños expuestos a muy largo plazo a la presencia de Pb en poca cantidad en sus alimentos, en el aire que respiran, en la tierra y el polvo en sus zonas de juego, todo lo cual se traduce en mayores (cuando rebasan los 25 $\mu\text{g}/\text{dl}$) concentraciones de plomo en sangre de muchos de ellos, y pueden ser causa de una intoxicación sutil del SNC que incluye discapacidades de aprendizaje, menor coeficiente intelectual y anormalidades en la conducta (Fig. 2)[Klassen, 1996].

En niños con concentraciones menores de Pb en sangre (10 $\mu\text{g}/\text{dl}$) [Needlman y col; Baghurts y col. 1992; Bellinger y col., 1992] se ha observado una mayor frecuencia de conducta hiperkinética con una disminución pequeña pero significativa en el coeficiente intelectual [Cassaret, 1991; Klassen, 1996].

La exposición prolongada al Pb puede causar efectos importantes en este sistema, como síntomas y signos leves (alteraciones en el aprendizaje ya que se ha observado un aumento de la incidencia de la conducta hiperkinética (Needleman, 1979; Cassarett, 1991), y una disminución en el cociente intelectual de los niños con concentraciones sanguíneas de plomo de 30-50 $\mu\text{g}/\text{dl}$. Estudios

realizados en fetos sugieren que el cerebro del feto puede ser todavía más sensible a los efectos tóxicos del Pb (Fig. 2)[Bellinger y col. 1992; Klassen, 1996].

2.3 Efectos gastrointestinales.

El Pb afecta el músculo liso del intestino, donde produce síntomas importantes como manifestación temprana del contacto o exposición al tóxico. El síndrome abdominal suele comenzar con síntomas imprecisos como anorexia, molestias musculares, malestar generalizado y cefalalgia. El estreñimiento suele ser un signo temprano, en particular en adultos, pero en ocasiones se presenta diarrea [Klassen, 1996], En los comienzos suele haber un regusto metálico persistente, al avanzar la intoxicación pueden intensificarse la anorexia y el estreñimiento y el dolor abdominal es intenso, los músculos en el abdomen se vuelven rígidos y dolorosos lo cual se manifiesta particularmente en la región del ombligo. [Janin y col, 1985; Cassaret, 1991; Klassen, 1996].

2.4 Efectos neuromusculares.

El síndrome neuromuscular, o parálisis saturnina, es una manifestación subaguda avanzada, hay debilidad muscular y la fatiga aparece antes de la parálisis real, los grupos musculares afectados suelen ser los más activos como los extensores del antebrazo, carpo y dedos de las manos y muñeca, y músculos extraoculares [Klassen, 1996]. También se han descrito cambios degenerativos en las motoneuronas y sus axones [Cassaret, 1991].

2.5 Efectos renales.

Los efectos del Pb en los riñones son menos impresionantes que los observados en el SNC y las vías gastrointestinales, pero se sabe de casos de nefropatía. La toxicidad ocurre en dos formas, un trastorno renal reversible y una nefropatía intersticial irreversible desde el punto de vista clínico se advierte un síndrome similar al de Fanconi, que incluye proteinuria, hematuria y cilindros en la orina [Craswell y col, 1987; Graff, 1989]. La hiperuricemia con gota aparece con mayor frecuencia en casos de nefropatía crónica por Pb [Klassen, 1996].

2.6 Efectos histopatológicos.

Los efectos morfológicos del Pb sobre el SNC son hemorragias múltiples, pérdida del contenido celular [Martin y col, 1977; Hirano y col, 1989], necrosis, hipertrofia y retracción de neuronas y células endoteliales, así como trombosis con marcada acumulación perivascular, con edema intersticial, la degeneración neuronal podría ser producida por los cambios vasculares y los efectos de compresión debido a la inflamación del cerebro. [Hirano y col, 1987]. Se ha observado un incremento en las células capilares [Hasan y col, 1989]. Estudios de microscopía óptica en encefalopatía de infantes muestran dilatación perivascular, hipertrofia endotelial, necrosis isquémica de las neuronas corticales, alteraciones en la barrera hematoencefálica así como proliferación microglial extensa [Hirano y col, 1989; Papaioannou y col, 1998]. Estudios por microscopía electrónica reportan

que hay edema extra e intercelular así como dilatación en mitocondrias y axones, con cambios en la permeabilidad de las membranas de los vasos y de las neuronas, vacuolizaciones focales del neuropilo, necrosis neuronal y alteraciones en los capilares [Papaioannou y col, 1998].

Raimondi y col, reportan que hay dilatación del retículo endoplásmico, en los astrocitos hay acumulación de gránulos de glicógeno, macrófagos con desechos absorbidos en los espacios extracelulares, formación de cuerpos densos en el neuropilo, citoplasma y núcleo [Hirano y col, 1989], estos cuerpos están compuestos de un complejo proteína-plomo, las proteínas son ácidas y contienen grandes cantidades de ácido aspártico y ácido glutámico y pocas cisteínas, esto indica que el Pb se pega libremente al grupo carboxilo de los aminoácidos [Casarett, 1991]. Estas proteínas han sido identificadas hasta los 3 días después del nacimiento pero hasta las dos semanas de edad alcanzaron los niveles máximos en el SNC. [Goyer y col, 1993; Clarkson y col, 1997]. Los axones muestran cambios degenerativos como vacuolización y desintegración de la mielina [Hirano y col, 1989].

2.7 Efectos genotóxicos.

El Pb está clasificado como un posible carcinogénico en humanos por la Internacional Agencia para la Investigación del Cáncer [IARC, 1983]. Es decir que hay suficientes evidencias en animales [Goyer y col, 1996]. Sin embargo su potencial "Tóxico" para producir cáncer en el hombre no ha sido suficientemente estudiado y las evidencias carcinogénicas del Pb son controversiales y están limitadas a pocos estudios en animales y humanos [Rhamed y col, 1973; Deknut, y col, 1973, Leonard, y col. 1973; Gerber y col, 1980; Saldivar y col, 1996].

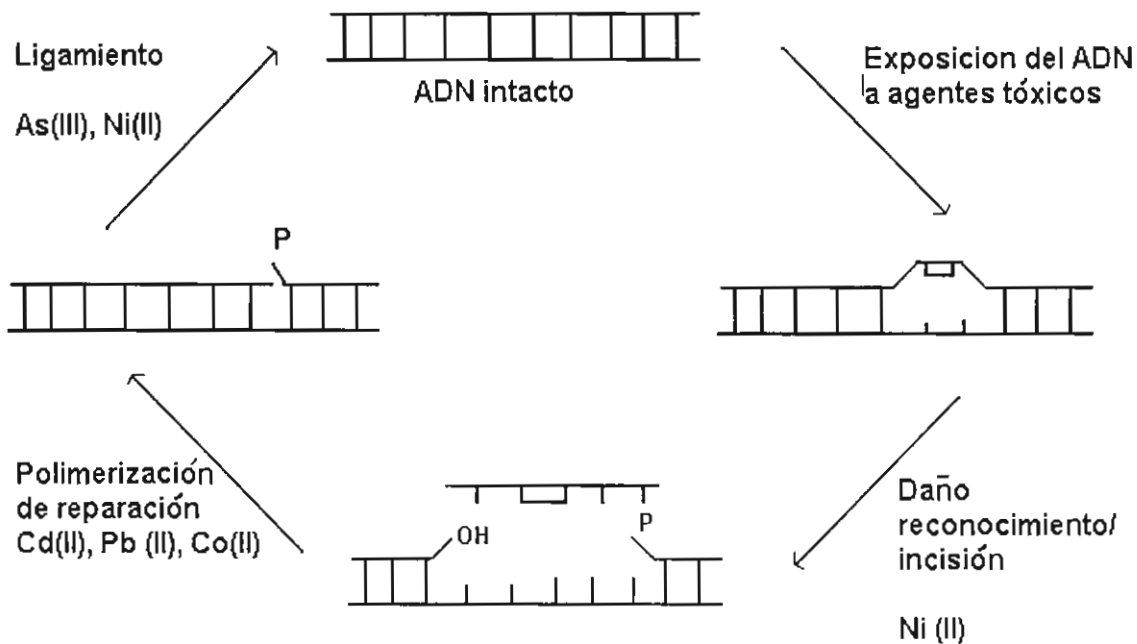


Figura 4.- Inhibición de el mecanismo de reparación de excisión de bases por metales en células de mamíferos, los sitios de acción propuestos (Tomado de Hartwig A. Biometals(1995), 8.3-11)

Estudios in vitro realizados por Zelikoff y col. (1988), proponen que los efectos mutagénicos del Pb se deben a que este metal altera los sistemas enzimáticos que intervienen en las síntesis y/o reparación del ADN (ácido desoxiribonucleico), estas evidencias confirman que la inhibición de los mecanismos de reparación del ADN pueden ser mecanismos importantes en la genotoxicidad y probablemente se deben a A) A los cambios estructurales del ADN, B) Las modificaciones de las proteínas de reparación [Hartwig y col, 1995] y C) La competición del Pb con los iones de zinc los cuales son esenciales para el funcionamiento de la ADN polimerasa (Fig. 4) [Hartwig y col , 1994, 1995].

Otro posible mecanismo por el cual el Pb puede afectar el material genético en su afinidad por los grupos fosfato de la molécula de ADN, que al unirse a ellos altera la estructura de la doble hélice y produzca las mutaciones (Christie y col. 1983). Las transformaciones morfológicas inducidas por el acetato de plomo pueden ser efectos directos del daño al ADN, pero pueden ocurrir vía mecanismos indirectos incluyendo alteraciones en las funciones enzimáticas importantes en la síntesis del ADN y/o en la reparación de la cadena del ADN [Goyer y col, 1993]. Estos efectos pueden ser influenciados por la deficiencia del calcio en la célula.

Por todos estos antecedentes las evidencias carcinogénicas y teratogénicas del Pb son discutibles y necesitan de más estudios para formar una opinión definitiva al respecto.

III.- MECANISMOS BIOQUIMICOS Y MOLECULARES DEL PLOMO

Los estudios neuroquímicos con animales expuestos a Pb son numerosos, sin embargo no proporcionan un comprensivo análisis sistemático de la química del cerebro [Needleman, 1992] por lo tanto se han considerado otros aspectos de la toxicidad del Pb [Bressler y col, 1991; y 1999].

Varios estudios establecen una interrelación entre el fierro, zinc y el Pb y entre el Pb y el Ca, porque interactúan con proteínas idénticas y posiblemente transportadoras que regulan la entrada del metal al intestino. La competencia entre el Fe y el Pb por la unión a las proteínas ha sido demostrada, hay una gran competencia entre el zinc y el Pb por el sitio de unión en la enzima deshidratasa del ácido δ -aminolevunílico ALAD [Bressler y col, 1999]. El metabolismo de las porfirinas puede ser alterado por la intoxicación del Pb en la síntesis del grupo hemo, bloqueando principalmente a la enzima ALAD y hay interferencia con la formación del porfobilinógeno aumentando la excreción de ambos en la orina. El Pb Inhibe la conversión enzimática de coproporfirinogenasa aumentando la excreción de la coproporfirin III [Cohen, 1989; Gürer, 1998; Bressler y col, 1999] (Fig. 3).

La intoxicación por Pb disminuye el suministro de la glucosa cerebral, sin embargo el metabolismo se retarda debido a la inhibición de varios sitios, hay varias evidencias que apoyan que el Pb interfiere en los procesos de maduración y compartamentación y son afectados los grupos sulfhídricos y varias enzimas, como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa una enzima esencial para la glicólisis, sin embargo, inhibe simultáneamente el ciclo del ácido tricarboxílico y las concentraciones del lactato y la piruvato se incrementan [Cohen, 1989; Bressler, 1991 y 1999].

3.1 Plomo y los Neurotransmisores

El Pb tiene dos acciones sobre la liberación de los neurotransmisores: 1) El Pb extracelular inhibe la entrada del Ca^{++} a través de los canales de Ca^{++} a la célula y también a las terminales nerviosas, una vez en el interior se produce una liberación espontánea de neurotransmisores, ya sea por la interacción directa de los procesos de liberación dependientes del Ca^{++} , 2) indirectamente por interferir con la homeostasis del Ca^{++} produce un incremento de la concentración del Ca^{++} citoplásmico [Bressler y col., 1991].

Algunas de las alteraciones producidas por el Pb parecen estar relacionadas con su capacidad, para la inhibición o acción mimética con el Ca^{++} , En el SNC, los iones de Ca^{++} juegan un papel especial en la liberación de los neurotransmisores en las terminales presinápticas [Bressler, 1991]. Las investigaciones sobre la neuroquímica del SNC en animales expuestos a Pb muestran una inhibición de la liberación de acetilcolina, y un incremento en la liberación de dopamina, norepinefrina y un estímulo de la liberación del GABA, [Bressler, 1991; Needleman, 1992], sin embargo los mecanismos por los cuales el plomo altera las funciones neuroquímicas de estos neurotransmisores en el cerebro son desconocidas [Silbergeld, 1978; Needleman, 1992].

Se ha reportado que la intoxicación por Pb produce alteraciones de los transmisores cuando los niveles de Pb fueron administrados a ratas y monos desde su nacimiento, su actividad motora se incrementó, también se observó hiperactividad en ratones [Cohen, 1989; Needleman, 1992]. Los efectos del Pb en los mecanismos neuroquímicos son altamente dependientes de la región estudiada los efectos más impresionantes en el contenido y la síntesis de la dopamina son observados en el sistema mesolímbico, corteza y ganglios basales los cuales pueden ser consistentes con los cambios en la actividad motora. Las funciones GABAérgicas en ratas expuestas a Pb, son afectados en los ganglios basales, cerebelo, mientras que las funciones colinérgicas son afectadas en toda la corteza cerebral e hipocampo [Needleman, 1992].

Por otro lado la Zn-pp un producto de la inhibición de la vía del grupo hemo modula la activación del NMDA y en presencia del Pb puede alterar la función glutamatérgica por la interacción Pb-glutamatérgica. El Pb bloquea los receptores del NMDA localizados en la sinapsis de células piramidales y de hipocampo produciendo alteraciones neurofisiológicas [Alkondon, 1990; Lasley, 2000]. Los efectos son específicos sobre los receptores del NMDA cuando hay altos niveles de Pb, la frecuencia de la apertura de canales activados de NMDA disminuye, sin embargo estos efectos no parecen ser causa de la interacción del Pb con los sitios de unión del Ca^{++} , pero si con la disminución del Ca^{++} intracelular, y el Mg ó con el sitio de unión del glutamato. Se ha reportado que el Pb disminuye la activación por glicina y aspartato sobre los canales del NMDA [Slechte y col, 1995;

Lasley, 2000; Gavazzo y col, 2001]. Estudios hechos en ratas de diferentes edades mostraron que hay un decremento en los sitios unión de los receptores a NMDA en corteza de ratas jóvenes, y en las ratas viejas se observa un incremento de los receptores NMDA. Esto nos indica que la exposición crónica de Pb antes del desarrollo neuronal puede alterar el sistema de aminoácidos excitadores [Dong y col, 1998; Guilarte y col, 2000].

El óxido nítrico (ON) es una molécula inestable de vida media corta, que juega un papel importante en la morfogénesis de la plasticidad sináptica. Algunas veces actúa como molécula mensajera y otras como neurotransmisor en el cerebro [Selvin-Testa y col, 1997; Moncada y col, 1989; Snyder; Bredt, 1991; Xu y col, 1998]. El ON es el producto de la reacción en la cual la sintasa del óxido nítrico (NOS) convierte a la arginina en citrulina y ON. La NOS se encuentra en dos isoformas la constitutiva (NOSc) y la inducible (NOSi) (Chen y col, 2000). Uno de los mecanismos principales por el cual el Pb puede causar alteraciones en el sistema nervioso central es la alteración en las células endoteliales de los capilares del cerebro y esto produce lesiones en la barrera hematoencefálica y a la vasculatura cerebral, esto se debe a la gran cantidad de NOSi presente en las células endoteliales [Kerper y Hinkle, 1997].

En ratas tratadas con bajas dosis de acetato de plomo se encontraron disminuidos los niveles de nitratos y nitritos en hipocampo, seguido de cerebelo, corteza frontal y cerebro medio, esto probablemente se deba al deterioro de la actividad de NOS

en estos tejidos. Estudios inmunohistoquímicos con anti-NOS se vio baja la inmunoreactividad y disminuido el tamaño neuronal en hipocampo, esto nos indica que el ON juega un papel importante en la memoria y su deterioro puede ser producido por los cambios en ON inducidos por el Pb. En corteza frontal los niveles de nitratos y nitritos son altos y se puede atribuir a que el Pb induce aumento de NOSi que esta presente en las células endoteliales y esto a su vez incrementa la cantidad de ON [Chen y col 2000] El Pb induce manifestaciones tóxicas en el sistema nervioso central por los cambios homeostáticos de los niveles de NO, a través de la alteración en las actividades de la NOSc y la NOSi [García y col, 1999;Chen y col, 2000]

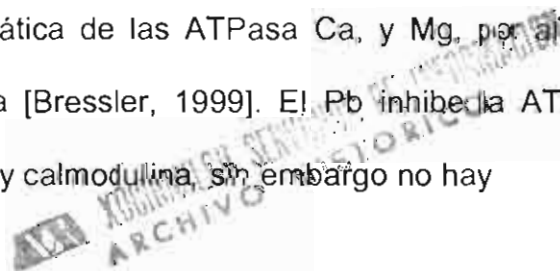
3.2 Plomo y el Metabolismo de Calcio

El calcio entra a las células a través canales específicos en la membrana plasmática, al entrar a la célula puede activar directamente ciertas enzimas o unirse a proteínas regulatorias como la calmodulina, cuando el Ca^{++} ocupa los sitios de unión en la calmodulina, estas proteínas cambian su configuración y son capaces de activar enzimas y sistemas de bombas, como las proteína cinasas [Needleman, 1992]. Algunos estudios indican que a concentraciones extremadamente bajas de Pb pueden sustituir al Ca^{++} en la activación de las proteín cinasas, que regulan un número de eventos celulares [Bressler y col, 1991].

Las diferentes clases de proteínas cinasas que existen son activadas por los segundos mensajeros, como el AMPc el cual a su vez se forma de la gran cantidad de ATP intracelular, el ATP es convertido en AMPc por la adenil ciclasa, los niveles de AMPc son balanceados entre la formación de adenil ciclasa y la degradación por la fosfodiesterasa. En algunos sistemas celulares el Pb inhibe la adenil ciclasa y estimula la fosfodiesterasa [Needleman, 1992]. La neurotoxicidad del Pb está asociada con la inhibición de adenilato ciclasa en la terminal postsináptica ligada con la función del receptor y puede interferir con los movimientos del Ca^{++} intracelular [Silbergeld, 1978; Bressler, 1999].

La proteína cinasa C es activada por segundos mensajeros dando como resultado la hidrólisis de inositol-fosfolípidos y la producción de Inositol trifosfato, el inositol trifosfato causa una elevación de la concentración del Ca^{++} por la liberación del calcio intracelular, el diacilglicerol en presencia del Ca^{++} activa la proteína cinasa C, esta proteína cinasa juega un papel regulatorio importante en la función celular, incluyendo la proliferación y diferenciación celular [Bressler y col, 1991, y 1999]. El Pb es un potente activador de las proteínas cinasas, por lo tanto el Pb activa todos los eventos a través de un mecanismo que depende de la proteína cinasa C. [Bressler y col, 1999].

El Pb inhibe la actividad enzimática de las ATPasa Ca , y Mg , por alterar la formación de la enzima fosforilada [Bressler, 1999]. El Pb inhibe la ATPasa a diferentes concentraciones de Ca^{++} y calmodulina, sin embargo no hay



información de la interacción del Pb con la bomba de Ca^{++} intracelular o con otros mecanismos de transporte de Ca en la membrana [Simons, 1993]. El Pb induce una elevación de Ca^{++} intracelular [Simons, 1993] y esto se debe a la liberación del Ca^{++} de las membranas mitocondriales y del retículo endoplásmico [Simons, 1993].

El Pb tiene gran afinidad por los sitios de unión de la calmodulina y este complejo podría activarse inapropiadamente aumentando la actividad de la fosfodiesterasa para disminuir el AMPc, esto causaría una disminución de la actividad de la proteína cinasa C y por lo tanto disminuye la sensibilidad de la terminal presináptica para controlar la liberación de los neurotransmisores produciendo grandes cambios en la conducción neuronal en la célula postsináptica [Needleman, 1992]. La proteína cinasa C es una proteína que es activada por el complejo calcio-calmodulina, cuando es activada por el Pb hay un incremento en la tasa basal de la liberación de algunos neurotransmisores por Pb [Bressler y col, 1991; Bressler, 1999]. El Pb actúa como agonista del Ca^{2+} e induce la liberación espontánea de neurotransmisores.

El Pb modula la liberación de los neurotransmisores por la alteración del metabolismo del Ca^{2+} , a) Por competencia con el Ca^{2+} para entrar a la célula por los mismos canales [Bressler, y col. 1999, b) Por el incremento en los niveles de Ca^{++} intracelular, así como también el Pb modula el metabolismo del Ca^{2+} en tejidos no excitables, esta respuesta es encontrada en diferentes tipos de células

y tejidos incluyendo microvasos cerebrales, arterias, músculo liso, hepatocitos, hueso [Bressler y col, 1991].

3.3 Radicales Libres

Entre los mecanismos de daño por plomo, la generación de radicales libres ha sido poco estudiada. Los radicales libres (RL) se pueden definir como moléculas que contienen uno o más electrones desapareados [Grisham, 1992]. Actualmente existen varios estudios que sugieren que los RL pueden estar implicados en una gama de enfermedades o estados patológicos, tanto en humanos como en animales, que van desde procesos inflamatorios como artritis reumatoide hasta neoplasia y envejecimiento [Grisham, 1992].

La protección fisiológica de los RL en el organismo es continua, pero también puede ser estimulada por exposición a agentes del medio ambiente como las radiaciones ionizantes y diversos xenobioticos entre los que se pueden mencionar a los insecticidas, compuestos halogenados (tetracloruro de carbono), fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades [Stohs, 1995]. Cada RL formado en el organismo puede iniciar una serie de reacciones en cadena que continúa hasta que estos son eliminados tras diversas reacciones con otros RL, o lo que es más importante, debido a la acción de los sistemas antioxidantes, que protegen a los tejidos de los efectos de estas especies químicas, sin embargo cualquier deficiencia en estos sistemas provoca una pérdida de protección de los tejidos y las alteraciones patológicas pueden aparecer [Cheeseman, 1993].

3.4. Los radicales libres más comunes

La reducción univalente del O_2 da lugar a la formación del anión superóxido (O_2^-) este es relativamente estable en el medio ambiente acuoso. En presencia de H_2O_2 y metales de transición como el hierro (Fe) y el cobre (Cu), se pueden generar radicales hidroxilo ($OH\cdot$), muy reactivos, mediante la reacción de Fenton catalizada por los mencionados metales. [Halliwell y Gutteridge 1989; Grisham 1992]. El H_2O_2 es un agente relativamente estable y es sintetizado por dismutación y/o reducción de O_2 en presencia de protones, es muy lipofílico por lo que atraviesa con facilidad la bicapa lipídica de la membrana celular.

Los RL pueden interactuar con los metales de transición (Fe y Cu) y con algunas hemoproteínas para dar lugar a la formación de RL muy reactivos como el $OH\cdot$. También pueden inhibir algunas enzimas mediante la oxidación de los grupos sulfhidrilos [Grisham, 1992]. Estos radicales son de vida muy corta, ejercen su efecto en el lugar donde se sintetizan y son muy reactivos, pueden dañar la estructura de las proteínas, del ADN, de los fosfolípidos de membrana, etc. siempre y cuando el metal catalizador se encuentre formando parte de estas biomoléculas que son esenciales para la sobrevivencia [Grisham, 1992], cuando los radicales hidroxilo interactúan con ciertos carbohidratos, proteínas, nucleótidos y lípidos, dan lugar a la producción de los RL peroxilo (ROO) como productos intermediarios, estos son menos reactivos y de vida media un poco más

prolongada que los $\text{OH}\cdot$ por lo que pueden ejercer sus efectos a distancia del lugar donde se originan, expandiendo la toxicidad del radical hidroxilo [Grisham, 1992].

Se han identificado mecanismos intracelulares que favorecen la síntesis del RL en concentraciones apreciables, tanto en condiciones fisiológicas, como en presencia de alguna alteración patológica [Kehrer, 1993].

La mitocondria es un organelo con potencial para generar RL mediante el sistema de transporte de electrones de la cadena respiratoria. Los RL sintetizados en la mitocondria parecen ser principalmente iones $\text{O}^{\cdot-}_2$ [Kehrer, 1993].

El sistema de oxidasas de función mixta (OFM) localizado en la fracción microsomal de la mayoría de las células de los mamíferos tienen como función facilitar la eliminación de sustancias tóxicas de los organismo mediante un serie de reacciones de oxido-reducción propias del metabolismo aeróbico para ello requiere de O_2 , de NADH, y de citocromo P_{450} . Aunque los mecanismos de producción de RL no son del todo claras se sugiere que las enzimas antes mencionadas que catalizar estas reacciones pueden ser responsables de la producción de RL [Grisham, 1992].

Otra fuente productora de $\text{O}^{\cdot-}_2$, de H_2O_2 , NO y probablemente de $\text{OH}\cdot$ son las células fagocíticas (polimorfonucleares, macrófagos etc.) del sistema inmune cuando son estimuladas [Grisham, 1992; Kehrer, 1993].

Existen diferentes enzimas citoplásmicas encargadas de oxidar diversos sustratos exógenos y endógenos que estimulan la formación de RL, la más estudiada es la xantina-oxidasa que reduce directamente al O_2 , oxigenando de esta manera, originando radicales O_2^- , H_2O_2 y tal vez $OH\cdot$ [Kehrer, 1993].

3.5. Mecanismos de Toxicidad

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio ante las reacciones de oxidación-reducción favoreciendo a las primeras, se produce durante el metabolismo aeróbico con el consecuente incremento de RL [Halliwell y Gutteridge, 1984]. Hay diversos trabajos de investigación, realizados a nivel experimental donde han estudiado el efecto que el estrés oxidativo tiene sobre las diferentes funciones celulares. Estos trabajos han evidenciado su capacidad para producir una amplia variedad de condiciones patológicas en los diferentes sistemas biológicos, dañando principalmente a los lípidos de las membranas celulares, proteínas y material genético de las células. Cuando el estrés oxidativo es muy intenso, también puede alterar los mecanismos que regulan el metabolismo de Ca^{2+} [Nicoletta y col, 1991].

La peroxidación de lípidos es la destrucción oxidativa de las membranas celulares producida por la exposición a RL u otros agentes oxidantes. Este evento se produce como una reacción en cadena que no es catalizada por enzimas, dañando seriamente a las células expuestas [Del Maestro, 1991] El daño oxidativo

es asociado con la presencia del Pb en cerebro y ha sido un posible mecanismo involucrado en la toxicidad del Pb [Adonaylo, 1999]. El malondealdehído (MDA) es un marcador de peroxidación de lípidos, y en presencia de Pb se ven incrementados los niveles [Daggett, y col. 1998]. y un aumento en la peroxidación de lípidos en cerebro. El Pb induce la generación de (especies reactivas de oxígeno) ROS y estas a su vez producen la peroxidación por la iniciación de una reacción en cadena en las membranas celulares, seguida por la propagación del daño a través de la célula, por el decremento en los niveles de fluidez de la membrana, la lipoperoxidación y elevados niveles de glutatión oxidado en todas las regiones del cerebro [Hsu y col, 1998]. La generación de ROS puede ser el efecto indirecto del Pb en las enzimas que actúan en los RL y el Glutatión [Flora y col, 2000].

El sistema nervioso es especialmente susceptible a la peroxidación debido a la riqueza de las membranas de este tejido de ácidos grasos polinsaturados y la pobre actividad de la catalasa y a la moderada concentración de superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa en el cerebro, también puede deberse al alto contenido de hierro en algunas regiones cerebrales preferencialmente en los ganglios basales, siendo este un ión necesario para procesos como la unión de neurotransmisores a sus receptores [Birnbain, 1988]. En estudios hechos en animales se ha reportado que el Pb altera el metabolismo y aumenta la peroxidación de lípidos debido a la inhibición de la superóxido dismutasa en todas

las regiones del cerebro estudiadas [Shkula y col., 1987; Skoczyynska y col., 1990; Antonio y col, 1999].

El Ca^{2+} juega un papel importante en la liberación de radicales del oxígeno, la entrada de Ca^{2+} al citosol y la activación de la proteína cinasa C tiene efectos sinérgicos en la liberación del superóxido de las células endoteliales [Traystam, 1991]. La alteración de la cadena respiratoria mitocondrial, mediada por el Ca^{2+} , puede incrementar a su vez la producción de radicales libres. De manera inversa, el daño mitocondrial iniciado por radicales libres puede disminuir la efectividad de las bombas para Ca^{2+} dependiente de energía y de esta forma bloquear la capacidad de la membrana plasmática para excluir el Ca^{2+} [Lebel, 1991]. Los radicales libres pueden potencialmente favorecer a la liberación excesiva de aminoácidos excitadores y estos a su vez favorece la generación de RL [Lebel, 1991].

Los RL y las ROS son potencialmente tóxicos. Las mitocondrias son particularmente susceptibles al daño oxidativo inducido por ROS. Recientes estudios han asociado las alteraciones mitocondriales producidos por ROS con la muerte celular accidental (necrosis) y la muerte celular programada (apoptosis) [Kowaltowski, 1999]. El Pb induce niveles altos de ROS y peroxidación de lípidos en las membranas tanto mitocondriales como celulares causando daños en las células de ratas expuestas a Pb, así como también producir daños en el ADN, proteínas y lípidos [Chi Hsu y col. 1998].

La membrana mitocondrial tiene sitios de compartamentación endocelular de Ca^{2+} , cuando se altera la permeabilidad de la membrana puede aumentar la liberación de Ca^{2+} en citosol [Viarengo, 1991]. Las membranas mitocondriales sufren peroxidación de lípidos produciendo a su vez alteraciones en las funciones mitocondriales como: respiración mitocondrial, fosforilación oxidativa y transporte de iones [Kowaltowski, 1999]. A pesar de la peroxidación de lípidos inducida por el citrato de Fe(II) en la membrana mitocondrial es estimulado por el Ca^{2+} , es improbable que el daño pueda depender de la generación de ROS. La mitocondria tiene tres componentes para llevar a cabo la reacción de fenton cuando el OH es generado en la mitocondria, este puede ser capaz de reaccionar con los lípidos en el interior de la membrana de la mitocondria causando peroxidación y pérdida del gradiente de protones. En situaciones donde la integridad de la membrana se pierde, la mitocondria desacopla la fosforilación oxidativa y no puede llegar a formar ATP [Robb-Gasper y col., 1997]. El estado reducido de la coenzima Q, el cual incrementa la generación de ROS en la cadena respiratoria que protege a la mitocondria del citrato de Fe(II) un conocido agente pro-oxidante. La coenzima Q reducida puede inhibir al Fe y no se producen radicales libres.

Los efectos bioquímicos del Pb en la función mitocondrial son: a) el bloqueo de los canales de Ca^{2+} , 2) Inhibición de la fosforilación oxidativa, 3) Inhibición de la respiración mitocondrial, y 4) La reducción del Ca^{2+} en sinaptosomas y mitocondrial [Silbergeld, 1978]. Esto probablemente se debe al aumento de oxiradicales, a la producción de peroxidación de lípidos en la membrana

mitocondrial y a la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Causando la liberación de Ca^{2+} en el citosol afectando la fisiología de la célula [Viarengo, 1991]. También el sistema de transporte de electrones y el citocromo C son afectados por la intoxicación del Pb [Cohen 1989; Bressler, 1999].

El ADN mitocondrial tiene proteínas esenciales que involucran procesos para la fosforilación oxidativa, estas pueden alterar la cadena respiratoria mitocondrial por la generación de ROS y el daño en el DNAmit. La actividad enzimática de la cadena respiratoria mitocondrial es afectada por el estrés oxidativo principalmente el complejo I y IV porque son los más sensibles, sin embargo el daño a las proteínas es también producido por el efecto protector del GSH y por la generación de ROS aumentando los daños en la mitocondria [Morais, 1999].



3.6 Sistemas de defensa antioxidantes

A pesar de que existe una alta concentración de moléculas oxidantes en SNC, este sistema tiene diversos mecanismos dedicados a la reducción [Coyle y col, 1993]. Las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) y los atrapadores de radicales libres y antioxidantes como el glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), ascorbato, tocoferoles como la vitamina E, β -caroteno y la bilirubina entre otros (Davies y col., 1990), protegen al organismo contra los efectos de daño de los RL. La SOD cataliza la formación de H_2O_2 a partir a partir de los radicales $O_2\downarrow$ [Hageman y col. 1992]. Por otro lado la catalasa se encarga de la detoxificación del $H^2O^2\downarrow$. El glutatión es un sistema de defensa que posee enzimas y cofactores disponibles para neutralizar peróxidos en general, la enzima más importante involucrada en esta secuencia es la GPx. [Hageman, y col, 1992]. Las neuronas y las células gliales contienen mecanismos protectores para combatir el estrés oxidativo, incluyendo mecanismos de limpieza de ROS [Robb-Gaspers y col,1997], sin embargo estos sistemas no están igualmente distribuidos en el cerebro, debido a esto las diferentes células pueden tener distinto rango de vulnerabilidad al daño oxidativo [Robb, 1997]. La catalasa es encontrada principalmente en oligodendrocitos [Mackenna y col., 1976] mientras que el glutatión es encontrado en astrocitos [Raps y col. 1989]. Estudios en riñón e hígado de ratas intoxicadas con acetato de Pb, muestran que los niveles de GSH

en riñón e hígado fueron significativamente bajos [Daggett y col, 1998]. El Pb podría disminuir la capacidad de las defensas del cerebro al estrés oxidativo y elevar la generación de ROS, con un suplemento de vitamina E ó C podría inhibir la generación de ROS en relación con el Pb. La vitamina E detiene la reacción en cadena de la peroxidación de lípidos en biomembranas y lipoproteínas inducida por el Pb [Hsu y col, 1998].

3.7 El Pb y sus Efectos en la Proteína Glial Fibrilar (GFAP)

El Pb es un tóxico para el sistema nervioso en desarrollo y las alteraciones no solo están limitadas en la población neuronal sino también en la población de células astrogliales. Previos estudios reportan un incremento en el número de astrocitos en toda la corteza encontrando cambios funcionales y estructurales de la respuesta de los astrocitos por la exposición al Pb [Bucheim, 1994 en Harry; Struzynska y col, 2001]. Los astrocitos en el cerebro se encargan de secuestrar el Pb del microambiente neural, estas células juegan un papel sustancial en numerosas funciones de axones mielinizados, guían la migración neuronal, regulan las concentraciones en el espacio extracelular, y la liberación de ciertos neurotransmisores. Tienen vínculos estrechos estrechas con las células endoteliales y la barrera hematoencefálica [Harry y col., 1996].

La proteína encontrada en los astrocitos en mayor cantidad es la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) esta proteína está principalmente en los astrocitos fibrosos [Harry y col. 1999] aunque también se ha encontrado expresada en oligodendrocitos [Zawia y col. 1996]. Estudios previos reportan un incremento en el tamaño de los astrocitos en hipocampo en ratas adultas expuestas a Pb desde los 7 días después del nacimiento, sin embargo hay una elevada inmunoreactividad a los 60 días después del nacimiento, en animales expuestos postnatalmente a Pb [Harry y col, 1996].

La dramática elevación de la GFAP y la inmunoreactividad de los astrocitos durante el desarrollo no se puede considerar que causen astrogliosis reactiva pero si representa un cambio en el número de células gliales y modifica el patrón de maduración de los astrocitos. Se ha observado que el Pb produce un incremento glial e induce un desarrollo precoz astrogliar así como una elevación en la inmunoreactividad de la GFAP 15 días después del nacimiento en ratas expuestas prenatalmente a Pb [Sündstrom y col. 1987: Struzynska y col, 2001].

El Pb puede acelerar la maduración de los astrocitos pero no la capacidad o la magnitud de la respuesta de los astrocitos al daño físico [Harry y col. 1997]. Sin embargo las consecuencias patológicas por la elevación dramática de la GFAP en el cerebro aún no son claras [Zawia y col. 1996]. Estudios hechos en hipocampo de ratas expuestas a bajas dosis de Pb se vio aumentada la expresión de GFAP en CA1 y CA2 [Partl y col, 1998].

La muerte celular puede ocurrir por dos mecanismos distintos, necrosis y apoptosis [Wyllie y col. 1980, Duke y col. 1996]. La necrosis también es llamada muerte accidental o patológica que ocurre cuando las células son expuestas a condiciones fisiológicas extremas (hipertermia, hipoxia) las cuales pueden dañar a la membrana plasmática que empieza con un deterioro de la célula cuando pierde la capacidad para mantener su homeostasis llevando a un influjo de agua y iones extracelulares, los organelos más alterados son las mitocondrias y hay lisis en la célula entera, debido a la alteración de la membrana plasmática, el contenido celular incluyendo enzimas lisosómicas son liberados al fluido extracelular. La muerte celular por necrosis esta asociada con el daño extensivo del tejido, produciendo en una intensa respuesta inflamatoria [Van y col., 1995; Portera y col. 1997]. La apoptosis es un modelo de muerte celular que ocurre dentro de las condiciones fisiológicas normales, la célula empieza su propio fallecimiento. La apoptosis muestra cambios característicos tanto morfológicos como bioquímicos, estas alteraciones son: agregación de la cromatina, condensación nuclear y citoplásmica ruptura de la membrana citoplásmica y nuclear encontrando vesículas o cuerpos apoptóticos, los cuales contienen ribosomas, mitocondrias morfológicamente intactas y material nuclear, estos cuerpos son rápidamente reconocidos y fagocitados por macrófagos y células epiteliales adyacentes [Choi, 1992; Portera y col, 1997]. Estudios hechos por Blankenship en 1997, muestran apoptosis en cultivo celular tratadas con altas dosis de Pb. El estrés oxidativo también puede inducir apoptosis, sin embargo hay pocos estudios al respecto [Simonian, 1996].

IV. Objetivo Principal

Analizar y determinar por medio de microscopía óptica, electrónica, inmunohistoquímica y peroxidación de lípidos, las alteraciones producidas en corteza parietal, estriado, hipocampo, tálamo, cerebelo, placenta y cordón umbilical de ratas en desarrollo intoxicadas con acetato de plomo a bajas dosis.

Objetivos Particulares

- Evaluar los niveles de plomo en corteza parietal, estriado, hipocampo, tálamo y cerebelo, placenta y cordón umbilical y sangre de ratas en desarrollo expuestas a acetato de plomo.
- Evaluar la peroxidación de lípidos en corteza parietal, estriado, hipocampo, tálamo y cerebelo, así como en sangre, placenta y cordón umbilical de ratas en desarrollo tratadas con acetato de plomo.
- Estudiar las alteraciones morfológicas de neuronas y células gliales, células placentarias y del cordón umbilical, de ratas en desarrollo intoxicadas con plomo a bajas dosis.
- Evaluar por inmunohistoquímica la reactividad de la proteína glial fibrilar en las diferentes regiones antes mencionadas de ratas tratadas con acetato de Pb.
- Estudiar las alteraciones ultraestructurales de neuronas y células endoteliales de corteza parietal, estriado hipocampo, tálamo y cerebelo de ratas tratadas con plomo.

V. Material y Método

5.1 Animales

Se utilizaron 45 ratas hembras gestantes, Cepa Wistar de 200-250 g. Obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía " M. Velasco Suárez". Las ratas se mantuvieron en cajas individuales de polipropileno con una temperatura aproximada de 22 0C, ciclos de luz-oscuridad de 12 h y una humedad relativa de 40%, fueron alimentadas con Purina Chow y agua ad-libitum. A las ratas se les hizo el frotis vaginal para determinar el estro, se aparearon y se confirmó el inicio de la gestación mediante la presencia de espermatozoides en la vagina de la rata. Desde el primer día de la gestación se iniciaron los tratamientos.

5.2 Tratamientos Experimentales

Como obtener acetato a una concentración de 160 ppm se pesaron 0.2929 g. de acetato de Pb, para un litro de agua. Y para obtener una concentración de 320 ppm, se pesaron 0.5859 g. de acetato de Pb. Los tratamientos fueron administrados en el agua de la bebida, se utilizó agua desionizada para disolver el Pb.

GRUPO CONTROL.- 10 ratas gestantes recibieron agua desionizada desde el primer día de la gestación,

GRUPO 1 (160 ppm). 10 ratas gestantes recibieron acetato de plomo a 160 ppm en la bebida desde el primer día de gestación,

GRUPO 2 (320) 10 ratas gestantes recibieron acetato de plomo a 320 ppm por la vía tiempo mencionado arriba.

Cinco ratas de cada grupo se sacrificaron a los 21 días de gestación, se sacrificaron 10 fetos al azar de cada grupo con sus respectivas placentas y cordones umbilicales, así mismo se disectaron (de acuerdo con la técnica descrita Iversen y Glowinski, 1966), la corteza parietal, el estriado, el tálamo y el cerebelo para la evaluación de los niveles de Pb. Otros 10 para determinar la peroxidación de lípidos en las mismas áreas ya mencionadas. Cinco fetos para el estudio histológico y 5 fetos más para el análisis ultraestructural. Las 5 ratas gestantes restantes de cada grupo se dejaron hasta que las crías cumplieron 45 días de edad, todo este tiempo permanecieron con acetato de plomo en la bebida, primero a través de la madre y después por si solos. Se sacrificaron 10 ratas al azar de cada grupo para la evaluación de los niveles de plomo en sangre, corteza parietal, estriado, hipocampo, tálamo y cerebelo. Otras 10 se sacrificaron para determinar la peroxidación de lípidos, en las misma áreas. cinco ratas fueron sacrificadas para el estudio histopatológico y cinco más para el estudio ultraestructural.

5.3 Determinación de plomo

5.3,1 En sangre

Las ratas fueron inyectadas 30 min antes de sacrificarse con .5 ml de EDTA al 1%. Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción cardiaca y para determinar el plomo en sangre se procedió de acuerdo con la técnica descrita por Miller y col. (1987). La sangre se colocó en tubos de plástico con EDTA, previamente lavados con ácido nítrico y enjuagados con agua desionizada, a cada tubo se le agregaron 200 µl de sangre y 800 µl de ácido nítrico al 30%, esto con el fin de precipitar las proteínas de la sangre, se centrifugaron a 15,000 rpm durante 15 minutos. Se guardó el sobrenadante en un tubo etiquetado y en refrigeración para su posterior medición. Del sobrenadante se tomaron 100 µl y se diluyeron con 400 µl de agua desionizada. Las muestras y los estándares se colocaron en el automuestreador del espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer 3110) con horno de grafito Perkin-Elmer H6-600, con las siguientes parámetros instrumentales:

Longitud de onda de Slit=283.3 nm,

Temperatura de secado 100 oC,

Temperatura de carbonización de 400 oC

Temperatura de atomización de 2,500 oC.

Estas condiciones se establecieron previamente utilizando estándares acuosos de Pb (estándar de referencia de Pb No 3128, obtenidos del "National Bureau of Standards, Gaithersburg, MD). Para determinar las condiciones óptimas del

programa térmico. Se leyeron repetidas veces las muestras de ácido nítrico y agua desionizada, para asegurar que no hubiera contaminación externa por Pb. La concentración de Pb fue determinado interpolando en una curva de calibración construida a partir de un estándar de Pb cuya concentración de almacenamiento fue de 10 mg/ml, certificada por "National Bureau of Standards", USA. De esta se tomó 0.5 ml y se diluyó en 100 ml de agua desionizada para obtener la solución de trabajo de 50 ppm (50 mg/L), a partir de la cual se prepararon las siguientes puntos de la curva con concentraciones para Pb de 10, 20, 40 y 80 µg/L. Las unidades fueron expresadas como µgr/ dl

5.3.2 En regiones cerebrales, placenta y cordón umbilical

Se sacrificaron 5 ratas de 21 días de gestación de cada grupo por decapitación, se seleccionaron 10 fetos y cinco ratas de 45 días de edad, se decapitaron y se disectaron de sus cerebros: la corteza parietal, el estriado, el tálamo, el cerebelo, la placenta y el cordón umbilical, se colocaron en tubos de plástico previamente lavados con ácido nítrico al 3%, se pesaron antes y después con el tejido para calcular por substracción el peso de tejido, se le agregaron 0.5 ml. de ácido nítrico suprapuro se dejaron tapados por 24 horas para que el tejido se degradará. La determinación del plomo se realizó con la técnica de Miller y Col. (1987), modificada por Ríos y col. 1989. Se tomaron 100 µl de la muestra más 400 µl de agua desionizada. Las muestras y los estándares se colocaron en el automuestreador que tomó un volumen fijo de 20 µl y cada uno de ellos se inyectó en el horno de grafito del espectrofotómetro de absorción atómica para que fueran

leídos, con los parámetros y condiciones instrumentales arriba mencionadas. La concentración del Pb fue determinado interpolando en una curva de calibración elaborada a partir de un estándar de Pb cuya concentración de almacenamiento fue 10 mg/ml, certificada por "National Bureau of Standards", USA. De esta se tomó 0.5 ml y se diluyó en 100 ml de agua desionizada para obtener la solución de trabajo de 50 ppm (50 mg/ml), a partir de la cual se prepararon las siguientes puntos de la curva con concentraciones para Pb de 10, 20, 40 y 80 µl/l. Las unidades fueron expresadas como µg/g de tejido fresco.

5.4 Determinación de la peroxidación de lípidos

5.4.1 En sangre:

Se inyectaron las ratas con 0.5 ml de EDTA al 1% y 30 min antes de sacrificarlas, se obtuvo la sangre mediante punción cardiaca. Y se colocó en tubos con EDTA. Se centrifugó la sangre por 10 min. a 500 rpm, se tomó una muestra de 0.5 ml, del sobrenadante y se colocaron en tubos de vidrio tapados de la luz, se le agregó 4 ml de la mezcla cloroformo-metanol 2:1, se agitaron en el vortex por 5 seg. enseguida se centrifugó por 10 min. a 500 rpm, se aspiró con la bomba de vacío la parte superior de la pastilla y de la fase inferior se tomaron 2.5 ml. y se le agregó 1 ml. de agua desionizada, se agitaron por 5 seg. en el vortex, se dejaron en hielo por 15 min, se extrajo con la bomba de vacío la parte superior, de la parte inferior clorofórmica se tomaron 900 µl de la muestra + 100 µl de metanol y la fluorescencia se determinó a longitudes de onda de 370 nm de excitación y de

430 nm de emisión. La sensibilidad del espectrofotómetro fue ajustada a 150 unidades de fluorescencia con la solución de quinina, el cero se ajustó con metanol. Los resultados se expresan como UF/ml extraído (Triggs y col. 1984).

5.4.2 Placenta y Cordón Umbilical.

La placenta y el cordón umbilical se homogenizaron con 3 ml de sol. salina, 1 ml se guardó en congelación para la determinación de proteínas, se tomó un ml de alícuota por duplicado del homogenizado en tubos tapados de la luz, se les agregaron 4 ml de la mezcla cloroformo-metanol (2:1) se agitaron por 5 seg. en un vortex, se centrifugaron por 10 min. a 3000 rpm, y se siguió el mismo procedimiento arriba mencionado. Los resultados se expresan como UF/mg de proteína.

5.4.3 En regiones cerebrales

Se sacrificaron 5 ratas gestantes de cada grupo, por decapitación y se seleccionaron 10 fetos de cada grupo y 5 ratas de 45 días de edad, se decapitaron y se disectaron de sus cerebros: la corteza parietal, el estriado, el tálamo y el cerebelo, el tejido se homogenizó con 3 ml de sol. salina, se tomaron alícuotas de 1 ml. por duplicado en tubos tapados de la luz y 1 ml se guardó en congelación para medir proteínas, a los duplicados se les agregó 4 ml de la mezcla cloroformo-metanol (2:1) se agitó mediante el vortex por 5 segundos y se dejaron en hielo por 30 min. Se aspiraron las proteínas con una bomba de vacío, de la

muestra que quedó se tomaron 900 μ l + 100 μ l de metanol se agitaron y se midieron en el espectrofotómetro de fluorescencia a longitudes de onda de 370 nm excitación y 430 de emisión. Los resultados se expresan como UF/mg de proteína (Triggs y col., 1984).

5.4.4 La determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas, el tejido se descongeló, y por duplicado se tomaron 50 μ l de muestra y se agregaron 950 μ l de agua desionizada se agitaron con el vortex. De esta mezcla se tomaron 400 μ l, se agregaron 2 ml de NaOH 0.1 N + 0.5 ml de Tartrato de Sodio y Potasio al 2% + 0.5 ml de CuSO₄ al 1%. Todo esto se agitó por 5 seg. y se dejó reposar por 10 min. Posteriormente a cada tubo se agregó 200 μ l de reactivo Folin-Fenol diluido previamente en agua desionizada en una proporción 1:1. Se agitó por 5 seg. y se dejó reposar por 30 min. La absorbancia del cromógeno azul fue medida en el Espectrofotómetro de ultravioleta visible a una longitud de onda de 550nm. Para obtener la concentración de proteínas se interpolan los valores de una curva estándar constituida con concentraciones conocidas de albumina bovina. Las unidades son expresadas en nmoles de proteína /gr. de tejido (Lowry, 1951).

5.5 Estudio histopatológico

Las ratas de 21 días de gestación de cada grupo se sacrificaron bajo anestesia con 0.03 ml de hidrato de cloral al 3.5%, se seleccionaron 5 fetos al azar y se

extrajo la placenta y el cordón umbilical, así mismo se sacrificaron cinco ratas de 45 días de edad posteriormente se perfundieron vía intracardiaca con solución salina a 4 °C seguido de una solución de formol al 10% también a 4 °C. Fueron disectados los cerebros y se guardaron en formol al 10 % durante 15 días. Las muestras de tejido fueron deshidratadas en alcoholes graduales y xilol seguidas de 2 baños de parafina y finalmente se incluyeron en bloques en parafina. Ya obtenidos los bloques se hicieron cortes con el micrótopo de 5 μ de grosor; estos cortes fueron adheridos a portaobjetos y después rehidratados para hacer la tinción. Se hicieron las técnicas de anilinas de hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson e impregnaciones argénticas; la doble impregnación simple en caliente, y la impregnación simple de Río-Hortega (Estrada y col. 1982; Heffes y col 1995). Los resultados fueron analizados y fotografiados con un fotomicroscopio Carl Zeiss FOMI II.

5.6 Análisis por microscopía electrónica

Las ratas fueron anestesiadas con 0.3 de hidrato de cloral al 3.5% por vía i.p y fueron perfundidas por vía intracardiaca con solución salina seguido de una solución fijadora de (Buffer de cacodilatos 3M, paraformaldehido 8%, glutaraldehido al 2.5%). Se realizó la disección de las regiones y los fragmentos y fueron puestos con más solución fijadora por 24 horas. Después de este tiempo se cambiaron a Buffer de cacodilatos a un pH 7.3 y fueron lavados dos veces por 10 minutos cada uno. Los tejidos fueron postfijados en tetraóxido de osmio al 1% durante 2 horas y lavados de nuevo en Buffer de cacodilatos en 3 cambios de 15

min. cada uno. Se deshidrataron con alcoholes graduales 70%, 80%, 96%,96%, y absoluto por 15 minutos cada uno. Finalmente fueron preincluidos con oxido de propileno de 3 cambios de 15 minutos cada uno, se dejaron en Epon-Oxido de propileno (1:2) por 24 horas y después en epon puro durante una hora para después incluirlos en bloques de epon 812 DMP30. Los moldes con los bloques fueron colocados dentro de un horno de polimerización a 60 °c. por 18 horas. Los cortes de los bloques fueron hechos en un ultramicrotomo Reicher-Jungk con cuchilla de cuarzo templado. Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina para determinar el área a estudiar. Se realizaron cortes finos que fueron adheridos a rejillas de níquel y contrastados con Acetato de Uranilo por 15 minutos, lavados con agua destilada y citrato de plomo por 5 minutos. Los cortes fueron analizados con un microscópio Electrónico Zeiss EM-10 (Hayatt 1981; Russell y col, 1992).

5.7 Análisis Inmunohistoquímico.

De los bloques ya incluidos, se hicieron cortes de 5 μ de grosor en el micrótopo de parafina. Estos cortes fueron adheridos a portaobjetos pretratados con silano (para evitar que se desprendan los cortes). Las secciones del tejido fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas desde alcohol absoluto hasta agua destilada. Se dejaron en Citrato de sodio, (para la recuperación antigénica) en baño María por diez minutos en el horno de microondas y se dejaron enfriar. Posteriormente las peroxidases endógenas fueron bloqueadas con peróxido de hidrógeno al 3% de 3-5 min a temperatura ambiente, se aplicó el anticuerpo

monoclonal contra la proteína glial fibrilar ácida de Sigma (con una dilución 1:125 para los fetos de 21 días de gestación y de 1:100 para los de 45 días de edad), durante 24 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después se aplicó el complejo estreptavidina conjugada con peroxidasa por 20 minutos a temperatura ambiente. Después de cada incubación las muestras fueron lavadas con Buffer salino de fosfatos (PBS) a un pH 7.6. Finalmente las inmunoreacciones fueron reveladas con Diaminobencidina por 5 minutos lavadas y contrateñidas con hematoxilina. Las laminillas fueron analizadas y fotografiadas con un fotomicroscopio Carl Zeiss FOMI II (Heffes y col. 1995).

5.8 Análisis morfométrico

Para el estudio morfométrico se tomaron al azar 5 laminillas de Cx, E, T, Hp, y Ce tanto de las crías de 21 días de gestación como de las de 45 días de edad, se observaron 3 campos de cada laminilla, a las cuales se les cuantificó el número total de neuronas, así como la densidad de las células sanas y las alteradas, también fue cuantificado el tamaño de células y núcleos, el número de astrocitos de las ratas de 45 días de edad, y la densidad del líquido cerebral en las diferentes regiones de ambos grupos, con aumentos de 20X y 40X. El análisis morfométrico se realizó por medio del sistema Leica IM1000 instalado en una computadora Pentium III, con la configuración de un microscopio Leica Modelo DMLS y una cámara digital de alta resolución modelo Hyper HA.

5.9 Análisis estadístico

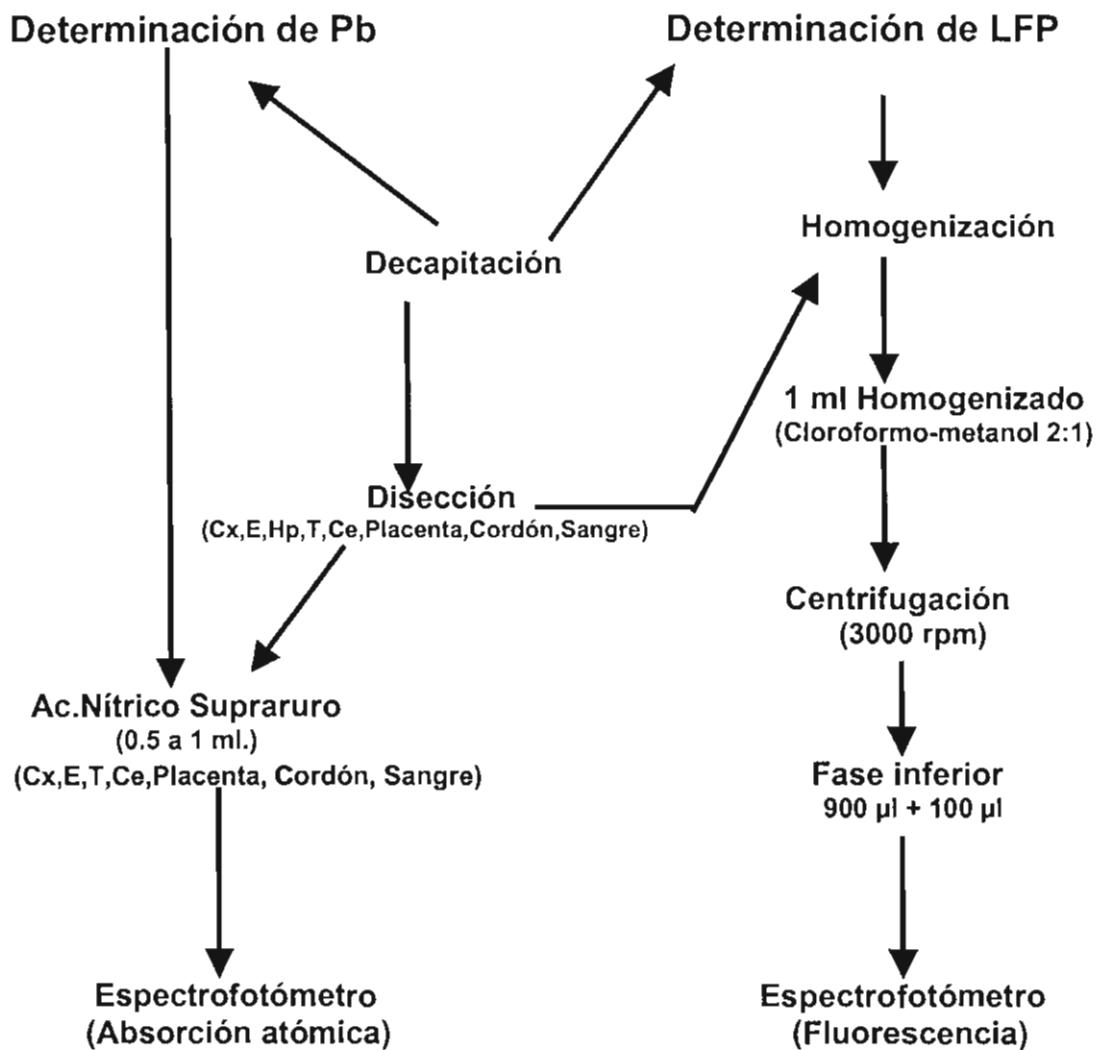
Los datos fueron analizados usando análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias entre el control y los grupos experimentales, seguidos por la prueba de Tukey para comparaciones múltiples (Steel, 1969; Brunnin, 1977; Infante, 1997). Los valores de $p < 0.05$ fueron escogidos para los niveles de significancia.

VI Resultados

6. Resultados Bioquímicos

Hipótesis I

Si el Pb es una neurotoxina que es transportada a través de la sangre, pasa la barrera placentaria y hematoencefálica, modifica varias reacciones enzimáticas y altera el metabolismo oxidativo celular, entonces se encontrarán altos los niveles de Pb y un incremento en la peroxidación de lípidos en sangre, placenta y cordón umbilical, corteza parietal, hipocampo, cuerpo estriado, tálamo y cerebelo de fetos y ratas en desarrollo tratadas crónicamente con acetato de Pb a bajas dosis.



6.1 Determinación de plomo

6.1.1 En sangre

La tabla I muestra las concentraciones de Pb en sangre, los valores representan el promedio + E.E (error estándar), con una diferencia significativa de * $p < 0.01$. Las concentraciones de plomo en sangre incrementan por 7.8 veces en el grupo que recibió 160 ppm. En el grupo con el tratamiento de 320 ppm el incremento fue de 10.4 veces comparados con el grupo control (fig. 5).

Tabla 1. Concentraciones de Pb en ratas de 45 días de edad expuestas acetato de Pb en el agua de bebida

Tratamiento	Sangre ($\mu\text{g}/\text{dl}$)
Control	3.0 ± 0.8
Pb (160 ppm)	$23.4 \pm .8$
Pb (320 ppm)	31.28 ± 1.8

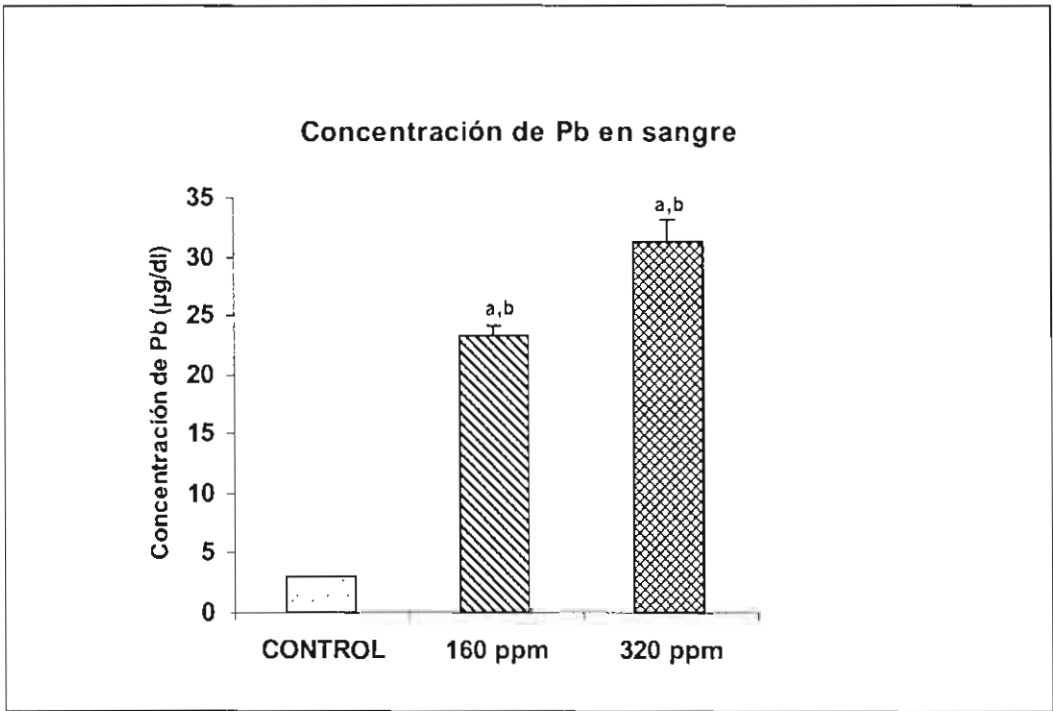


Figura 5 Niveles de Pb en sangre de ratas de 45 días de edad expuestas prenatalmente a 160 y 320 ppm de acetato de Pb. Cada barra representa el promedio \pm E.E de 10 experimentos. a= $P < 0,05$ diferente vs control; b= $p < 0.05$ 160 ppm diferente vs 320ppm. Después de aplicar ANOVA seguida de la prueba Tukey.

6.1.2 En Placenta y Cordón Umbilical

La tabla 2 muestra las concentraciones de Pb en placenta y cordón umbilical, los valores se expresan en promedio \pm E.E con una diferencia significativa de $p < 0.01$. Las concentraciones de plomo en placenta y cordón umbilical del grupo tratado con 160 ppm, se incrementaron respectivamente en 3.9 y 1.7 veces, el grupo con el tratamiento de 320 ppm se vio incrementado hasta 5.0 y 2.0 veces más, con respecto a los valores del grupo control (Fig. 6).

Tabla 2. Concentraciones de Pb en placenta y cordón umbilical de fetos de 21 días de gestación expuestos a acetato de Pb

Tratamiento	Placenta ($\mu\text{g}/\text{gr}$ de tejido)	Cordón Umbilical ($\mu\text{g}/\text{gr}$ tejido)
Control	12.3\pm1.48	21.3\pm2.5
Pb (160 ppm)	48.8\pm9.6	38.43\pm4.5
Pb (320 ppm)	62.0\pm13.2	44.9\pm13.2

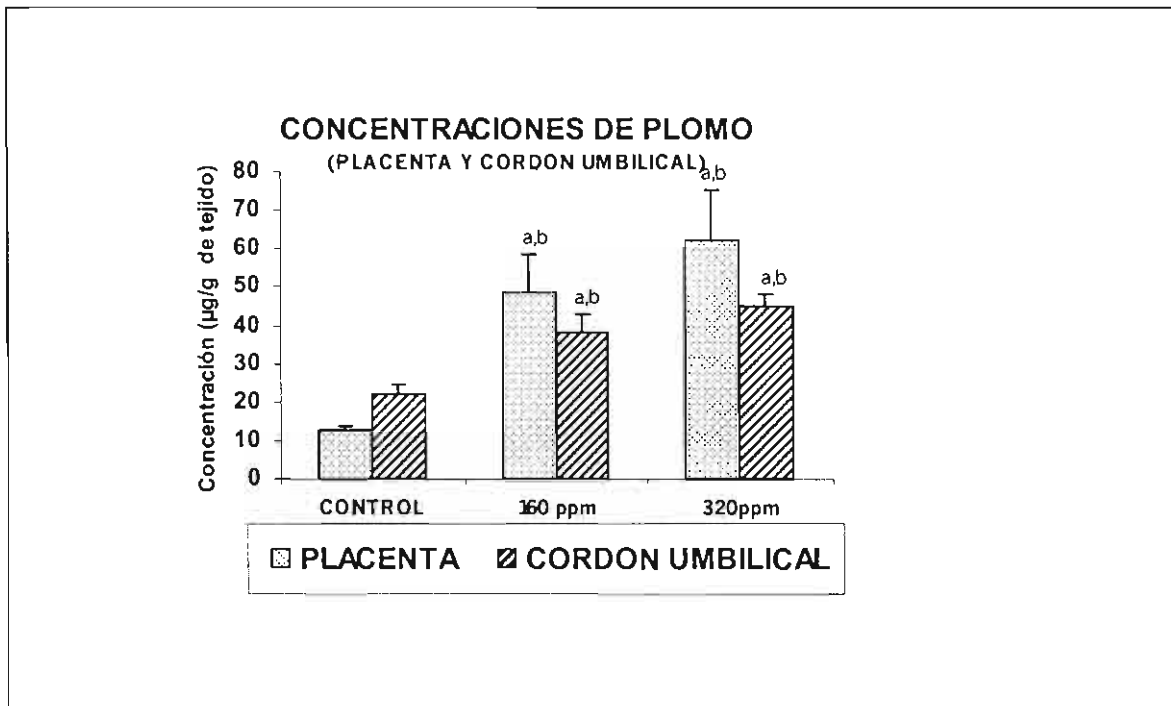


Figura 6.- Concentraciones de plomo en placenta y cordón umbilical. Cada barra representa el promedio \pm E.E de 10 experimentos por grupo. a= $p < 0.05$ diferente vs grupo control; b= $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm. Después de aplicar ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

6.1.3 En regiones Cerebrales

La tabla 3 muestra el promedio de las concentraciones de Pb en corteza parietal, estriado, tálamo y cerebelo, de los fetos de 21 días de gestación, después del tratamiento con 160 ppm, los valores se expresan en promedio \pm E.E, con una diferencia significativa de $p < 0.01$. Puede observarse que el grupo con tratamiento de 160 ppm aumentó a 21.9, 31.8, 20.9 y 24.0 veces, y en el grupo con el tratamiento de 320 se incrementó un 40.8, 41.2, 31.2 y 35.4 veces más, en comparación con el grupo control de cada región, respectivamente (Fig. 7).

Tabla 3. Niveles de Pb en Regiones Cerebrales
(de fetos de 21 días de gestación, expuestos a acetato de Pb)

Tratamiento	C. parietal	Estriado	Tálamo	Cerebelo
Control ($\mu\text{gr/gr}$ tejido)	2.53 \pm6.4	2.25\pm.18	3.41\pm.65	2.79\pm.45
Pb (160 ppm) ($\mu\text{gr/gr}$ tejido)	55.6\pm6.4	71.6\pm11.9	71.37\pm10	67.19\pm11
Pb (320 ppm) ($\mu\text{gr/gr}$ tejido)	103\pm5.9	101.5\pm6.8	106.5\pm10	98.95\pm7.8

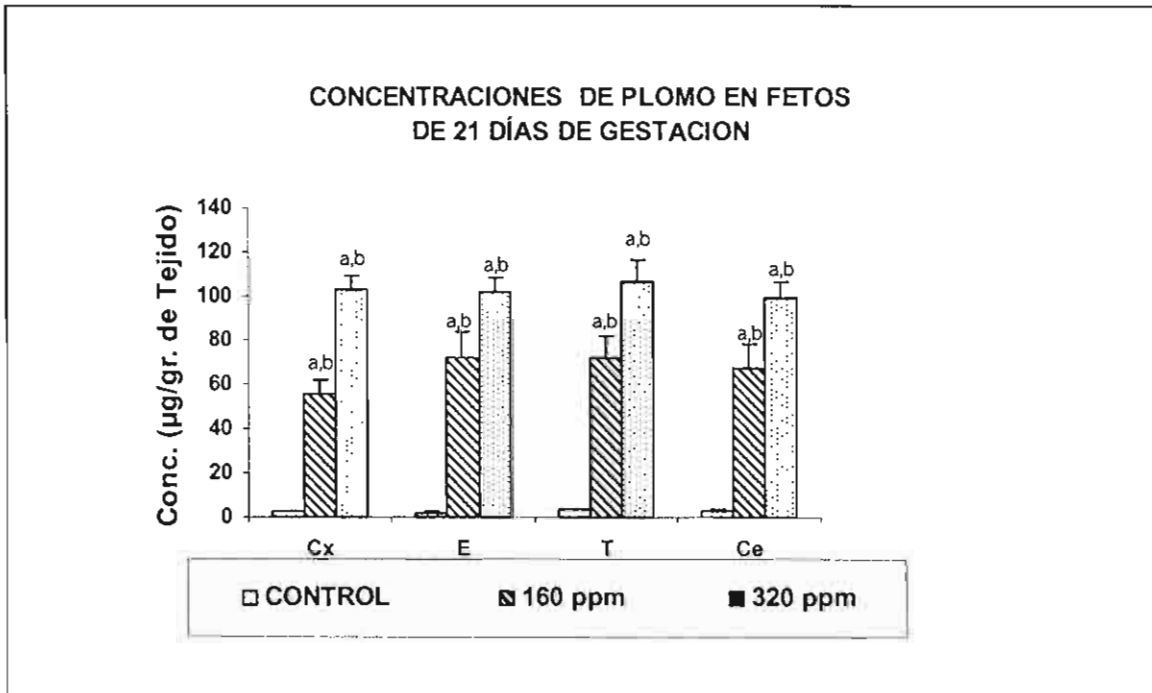


Figura 7.- Muestra las concentraciones de Pb en regiones cerebrales de ratas expuestas a 160 y 320 ppm de acetato de Pb en el agua durante 21 días de gestación, Cx=corteza parietal, E= estriado, T=tálamo, Ce=cerebelo. Cada barra representa el promedio \pm E.E de 10 experimentos por grupo. a = $p < 0.05$ diferente vs grupo control; b = $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm. Después de aplicar ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

La tabla 4 Muestra el promedio obtenido de la concentración de Pb (n=10) en Corteza parietal, estriado, hipocampo, tálamo y cerebelo, de ratas de 45 días de edad. Estas concentraciones se elevaron en el grupo con tratamiento de 160 ppm a 7.8, 11.1, 8.8, 6.5 y 7.3 veces, y el grupo con el tratamiento de 320 ppm se incrementaron en un 12.0, 13.3, 11.5, 10.1 y 9.7 veces más, en comparación con los promedios de los respectivos controles. Con diferencias significativas de $p < 0.01$ (Fig. 8).

Tabla 4. Concentraciones de Pb en Regiones Cerebrales de Ratas de 45 días de edad expuestas a acetato de Pb

Tratamiento	C. Parietal	Estriado	Tálamo	Hipocampo	Cerebelo
Control ($\mu\text{gr/gr}$ tejido)	6.2±1.08	5.6±1.3	6.9±1.0	7.5±1.4	5.2±1.3
Pb(160 ppm) ($\mu\text{gr/gr}$ tejido)	48.3±3.2	62.5±4.3	60.9±11.3	48.9±3.2	38±2.7
Pb(320 ppm) ($\mu\text{gr/gr}$ tejido)	74.9±2.9	74.4±12.8	79.4±14.3	56.4±5.7	50.6±4.1

CONCENTRACIONES DE PLOMO EN ENCEFALO DE RATAS DE 45 DIAS DE EDAD

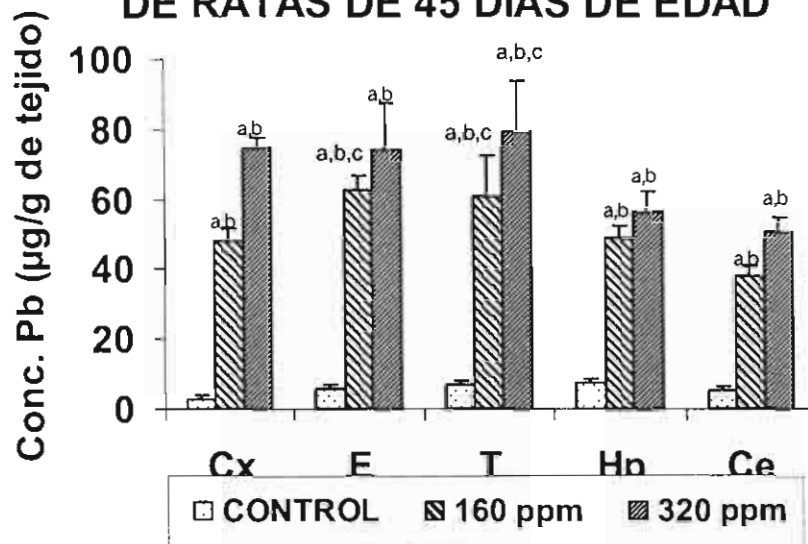


Figura 8 Concentraciones de Pb en regiones cerebrales (Cx=corteza parietal, E=estriado, T=tálamo, Hp=Hipocampo y Ce=cerebelo), de ratas de 45 días de edad expuestas prenatalmente a 160 y 320 ppm de acetato de Pb. Cada barra representa el promedio \pm E.E de 10 experimentos por grupo. a = $p < 0.05$ diferente vs grupo control; b = $p < 0.05$ 160 ppm diferente vs 320 ppm; c = $p < 0.05$ diferente vs regiones. Después de aplicar ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

6.2 Determinación de la peroxidación de lípidos

6.2.1 En sangre

La tabla 5 muestra los niveles de los productos lipídicos fluorescentes (LFP), en sangre de ratas de 45 días de edad, después de los tratamientos con 160 y 320 ppm de Pb. Los resultados muestran el promedio \pm E.E (error estándar), observando un incremento de 1.4 y 1.9 veces mas alto, con respecto a los valores del grupo control (Fig. 9).

Tabla 5 Formación de Productos Fluorescentes

Tratamiento	Sangre (UF/dl)
Control	24.08 \pm 2.6
Pb (160 ppm)	33.29 \pm 1.7
Pb (320 ppm)	44.6 \pm 5.4

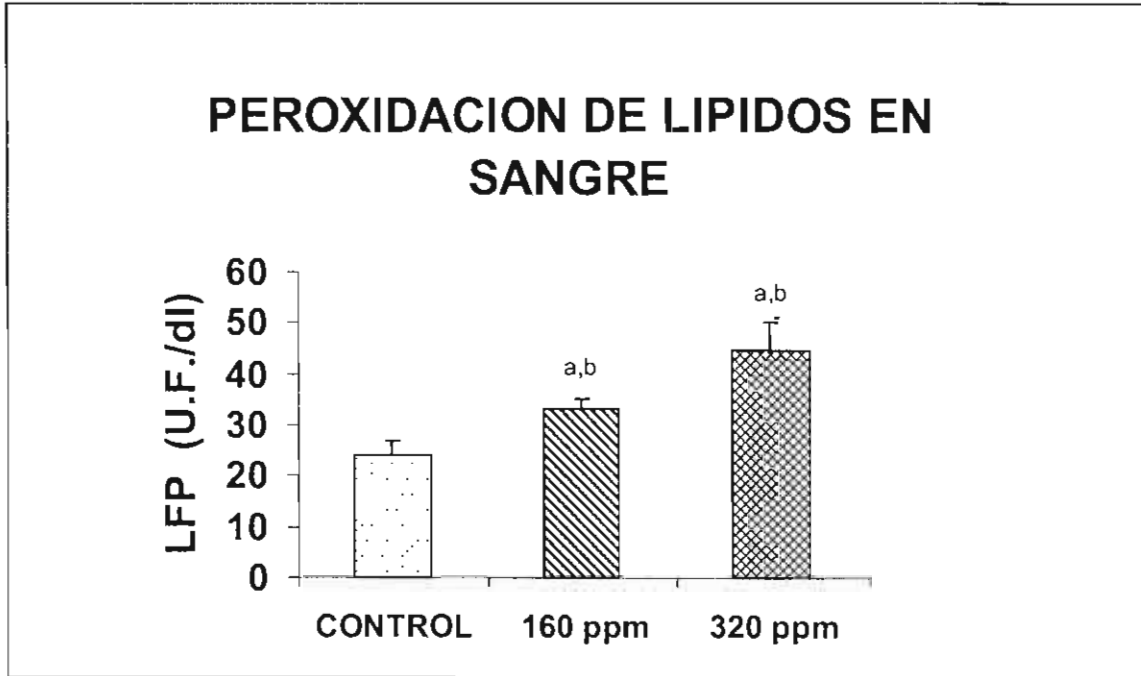


Figura 9.- Peroxidación de lípidos en sangre de ratas expuestas prenatalmente a 160 y 320 ppm de acetato de Pb. Cada barra representa el promedio \pm de 10 experimentos por grupo. a = $p < 0.05$ diferente vs grupo control; b = $p < 0.05$ 160 ppm diferente vs 320 ppm Después de aplicar ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

6.2.2 En Placenta y Cordón Umbilical

La tabla 6 muestra los niveles de LFP en placenta y cordón umbilical de fetos de 21 días de gestación que recibieron 160 y 320 ppm. Los valores expresan el promedio \pm E.E (error estándar) con una diferencia significativa de $p < 0.01$. Estos resultados fueron elevados en 1.7 y 2.5 veces más, y en el grupo con el tratamiento de 320 ppm se vieron incrementados un 2.1 y 3.7 veces más, con respecto a los valores del grupo control (Fig. 10).

Tabla 6. Formación de Productos fluorescentes

Tratamiento	Placenta	Cordón Umbilical
Control (UF/mg de proteína)	37.9\pm4.6	129\pm10.2
Pb (160 ppm) (UF/mg de proteína)	67.6\pm6.6	335.8\pm64.8
Pb (320 ppm) (UF/mg de proteína)	81.6\pm8.4	481.5\pm80.03

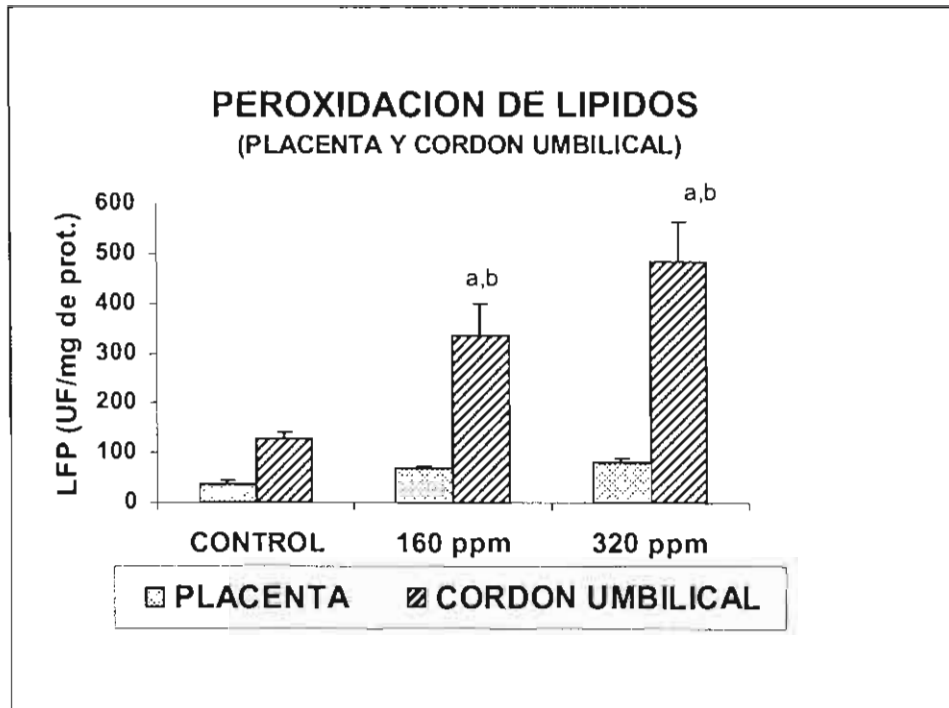


Figura 10.- Productos fluorescentes lipídicos de placenta y cordón umbilical. Cada barra representa el promedio de 10 experimentos por grupo. a= $P < 0.05$ diferente vs el grupo control; b= $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm. Después de aplicar ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

6.2.3 En regiones cerebrales

La tabla 7 muestra los niveles de los productos fluorescentes lipídicos en corteza parietal, estriado, tálamo y cerebelo de fetos de 21 días de gestación después del tratamiento con 160 ppm. Los valores se expresan el promedio \pm E.E (error estándar) con una diferencia significativa de $p < 0.01$. Los productos fluorescentes analizados por ultravioleta visible en 10 muestras se incrementaron un 2.5, 2.2, 1.5 y 2.7 veces más y en el grupo con el tratamiento de 320 ppm minimamente se elevaron un 2.6, 2.6, 1.8 y 3.1 veces más, con respecto a los valores del grupo control (Fig. 11).

Tabla 7. Formación de Productos Fluorescentes en Regiones Cerebrales
(de fetos de 21 días de gestación expuestos a acetato de Pb)

Tratamiento	C. parietal	Estriado	Tálamo	Cerebelo
Control (UF/mg de proteína)	198.5\pm16.2	268.3\pm18.1	255.6\pm7.7	192.8\pm16.9
Pb (160 ppm) (UF/mg de proteína)	491.1\pm51	607.7\pm78	402.5\pm21	537.4\pm60
Pb (320 ppm) (UF/mg de proteína)	517.8\pm75	717.5\pm74	469.4\pm21	612.8\pm73

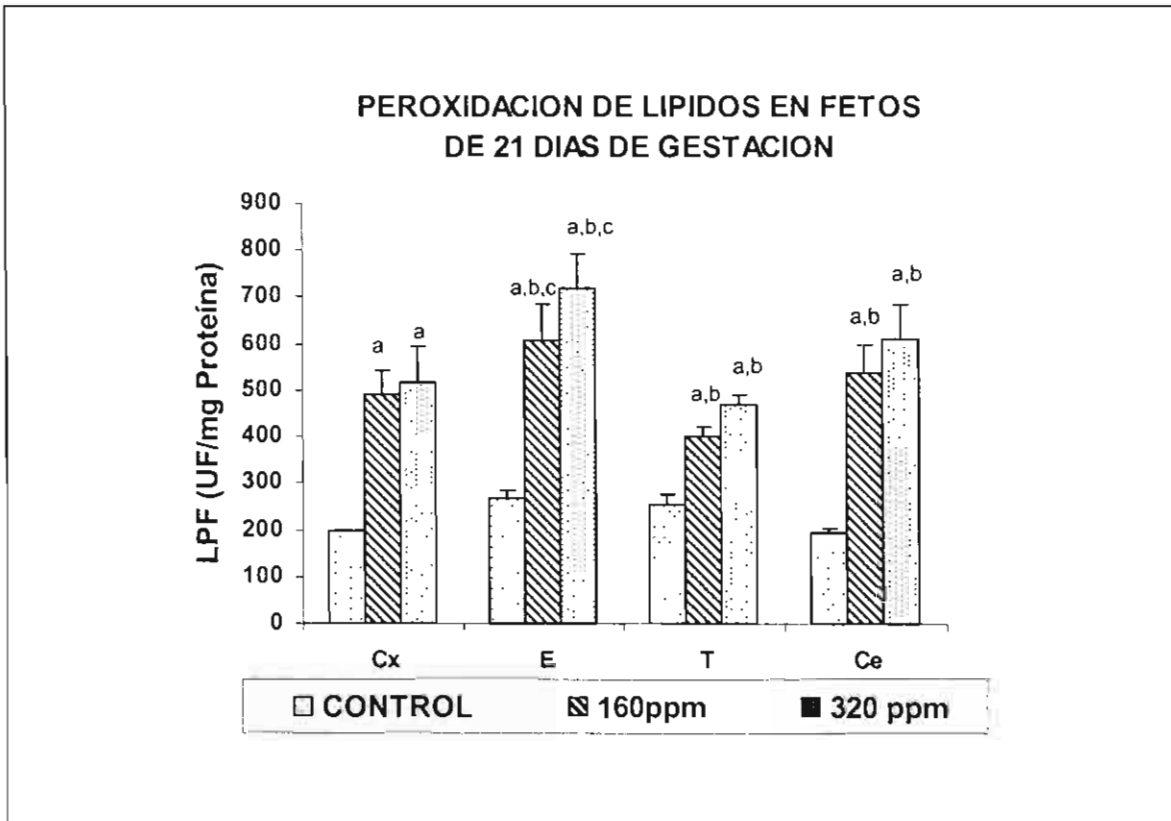


Figura 11.- Muestra los Productos Fluorescentes lipídicos en regiones (Cx=corteza parietal, E=estriado, T= tálamo, Ce=cerebelo) cerebrales de fetos de 21 días de gestación. Cada barra representa el promedio \pm E.E de 10 experimentos por grupo. a = $p < 0.05$ diferente vs grupo control; b = $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm; c = $p < 0.05$ diferente vs regiones. Después de aplicar ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

La tabla 8. muestra que los niveles de los productos fluorescentes lipídicos en la corteza parietal, el estriado, el tálamo y el cerebelo de ratas de 45 días de edad después del tratamiento con 160 ppm de Pb. Los valores se expresan en promedio \pm E.E (error estándar) con una diferencia significativa de $p < 0.01$, Los productos fluorescentes analizados por ultravioleta visible en 10 muestras, fueron incrementados por 2.3, 3.6, 4.2, 2.7 y 2.0 veces más alto y el grupo que recibió 320 ppm aumento un 3.3, 5.5, 6.2, 3.7 y 3.0 veces más, en comparación a los valores control de cada región respectivamente (Fig, 12).

Tabla 8. Formación de Productos Fluorescentes en
(Regiones Cerebrales de Ratas de 45 días de edad)

Tratamiento	C. Parietal	Estriado	Tálamo	Hipocampo	Cerebelo
Control (UF/mg de proteína)	51.2 \pm 7.2	54.4 \pm 7.8	51.3 \pm 7.2	79.9 \pm 10.1	61.2 \pm 7.4
Pb(160 ppm) (UF/mg de proteína)	119.5 \pm 14	197.9 \pm 28	213 \pm 20.9	219.5 \pm 32	121.5 \pm 21
Pb(320 ppm) (UF/mg de proteína)	173.7 \pm 17	297.1 \pm 14	318 \pm 15	300 \pm 28	185.4 \pm 23

PEROXIDACION DE LIPIDOS RATAS 45 DÍAS DE EDAD

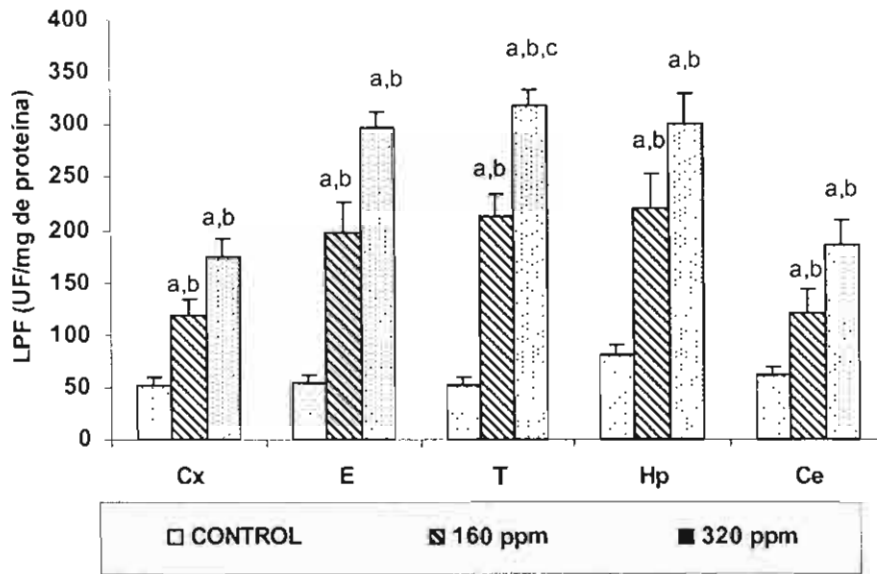


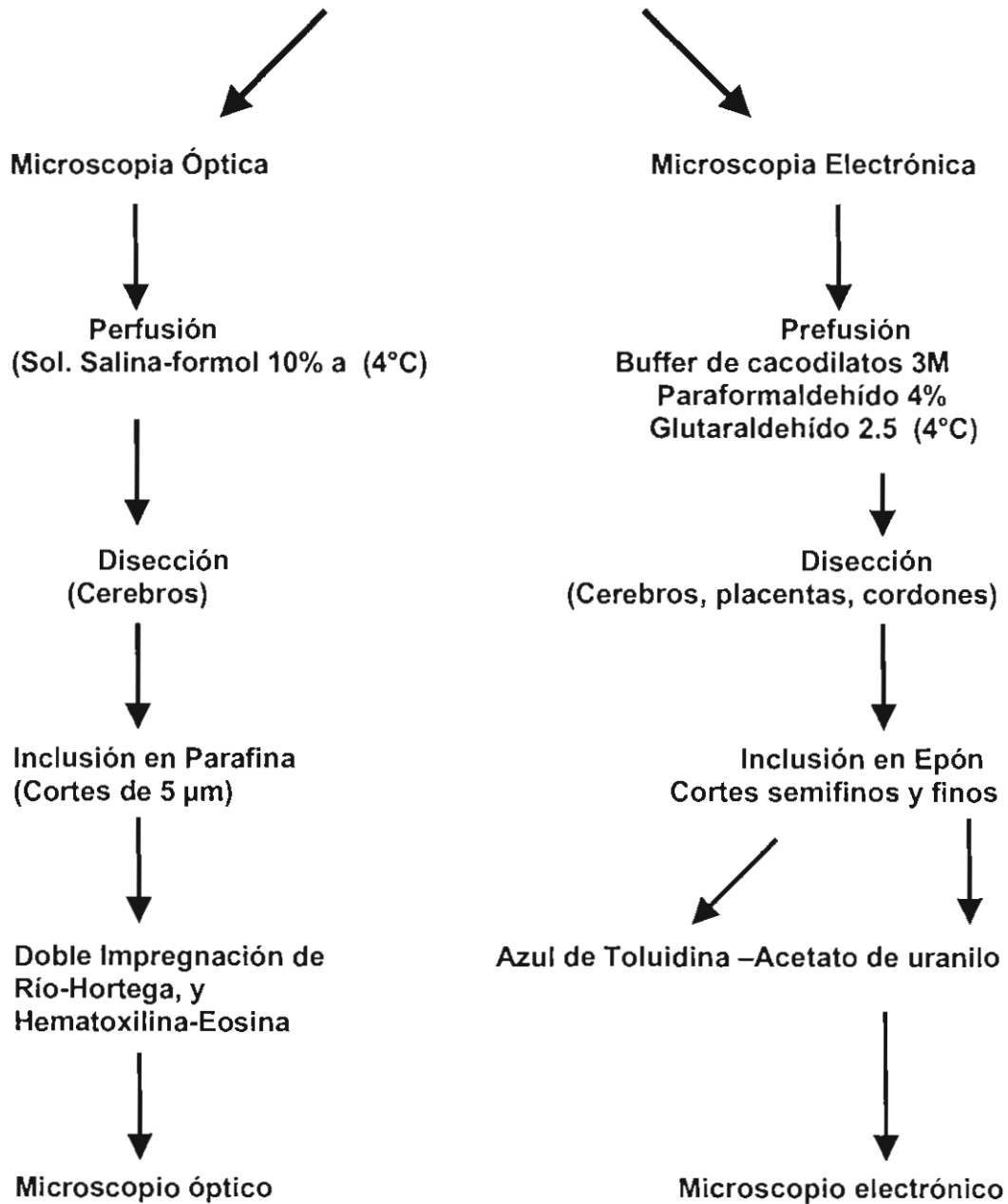
Figura 12 Muestra la peroxidación de lípidos, como productos fluorescentes lipídicos en regiones cerebrales (Cx=corteza cerebral, E=estriado, T=tálamo, Hp=hipocampo, Ce=cerebelo). de ratas expuestas perinatalmente a 160 y 320 ppm de acetato de Pb. Cada barra representa el promedio \pm E.E. a = $p < 0.05$ diferente vs grupo control; b = $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm; c = $p < 0.05$ diferente vs regiones. Después de aplicar ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

6.3. Resultados Morfológicos

HIPOTESIS II

Si los niveles de Plomo es elevado en sangre, placenta, cordón umbilical, corteza, hipocampo, estriado, tálamo y cerebelo y produce daño oxidativo. Entonces se encontraran alteraciones morfológicas en estos órganos y regiones estudiadas.

**Se sacrificaron y anestesiaron
(Hidrato de cloral 3.5%)**



En los fetos de 21 días de gestación del grupo control, las células tanto de la placenta como del cordón umbilical presentan una apariencia normal (Fig. 13 A,D). En los fetos de 21 días de gestación, cuya madre recibió 160 ppm de acetato de plomo, el cordón umbilical presenta varias células hipercromáticas, edema intersticial leve. En la placenta hay una congestión vascular intensa, algunas células presentan núcleos hipercromáticos, otras se observan con vacuolas citoplásmicas, algunos núcleos presentan fragmentación en su cromatina (Fig. 13 B,E). En el grupo que recibió el tratamiento con 320 ppm el cordón umbilical presentó intenso edema intersticial y células hipercromáticas. Las células placentarias de la porción fetal se observa muy afectada, presenta congestión vascular intensa, la mayoría de las células tienen núcleos con fragmentación de la cromatina y vacuolización citoplásmica (Fig. 13 C,F).

Las regiones del encéfalo de los fetos del grupo control, muestran una apariencia normal (Figs.14 A,B,C,D,E). En las regiones de los fetos de 21 días de gestación después del tratamiento con 160 ppm de acetato de plomo, todas las regiones (corteza parietal, estriado, hipocampo, tálamo y cerebelo) presentan núcleos con fragmentación en la cromatina, células con núcleos hipercromáticos, y edema intersticial leve (Figs. 14 F,G,H,I,J).

Las regiones de los fetos, cuyas madres recibieron acetato de plomo a una concentración de 320 ppm se observó; que en las distintas áreas cerebrales (corteza parietal, estriado, hipocampo, tálamo y cerebelo), se presentan células

hipercromáticas, núcleos con fragmentación de la cromatina y edema intersticial intenso. (Figs. 14 K,L,M,N,Ñ).

En las ratas de 45 días de edad del grupo control se observa una apariencia normal (Figs. 15 A,B,C,D,F) y las ratas que fueron tratadas con acetato de plomo a una concentración de 160 ppm. En las distintas áreas del cerebrales (corteza parietal, estriado, hipocampo, tálamo y cerebelo) se presentan pocas células con hipercromacia y retracción nucleosomática principalmente las células de purkinje, algunas presentan vacuolización citoplásmica y cromatólisis, núcleos con fragmentación en la cromatina, leve edema intersticial (Fig. 15 G,H,I,J,K). En ratas de 45 días de edad que fueron tratadas con acetato de plomo a una concentración de 320 ppm las distintas áreas cerebrales (corteza parietal, estriado, hipocampo, tálamo y cerebelo), se observa retracción nucleosomática, algunas células con hipercromacia, y otras neuronas se observan con vacuolización citoplásmica y cromatólisis, algunos núcleos con fragmentación de la cromatina (Fig. 15 M,N,Ñ,O,P) y severo edema intersticial (Fig. 15 L y Q).

6.3.1 Análisis por microscopía electrónica

Las neuronas de las diferentes regiones (corteza parietal, estriado, hipocampo, tálamo y cerebelo), de los fetos de 21 días de gestación y de 45 días de edad de los grupos control, mostraron una apariencia normal (Figs. 16 y 17 A,D). En las células de las áreas cerebrales de los grupos cuyas madres tratadas con acetato de Pb a 160 ppm mostraron vesículas densas en el núcleo, cromatina granular condensada y cromatina marginal condensada,

edema intracelular y del neuropilo (16 y 17 B,E). En las células de las regiones de los grupos tratados con 320 ppm se observaron las mismas lesiones tanto en las neuronas como en las células endoteliales, similares a las observadas en el grupo anterior pero más intensas (16 y 17 C,F).

Placenta

Cordón Umbilical

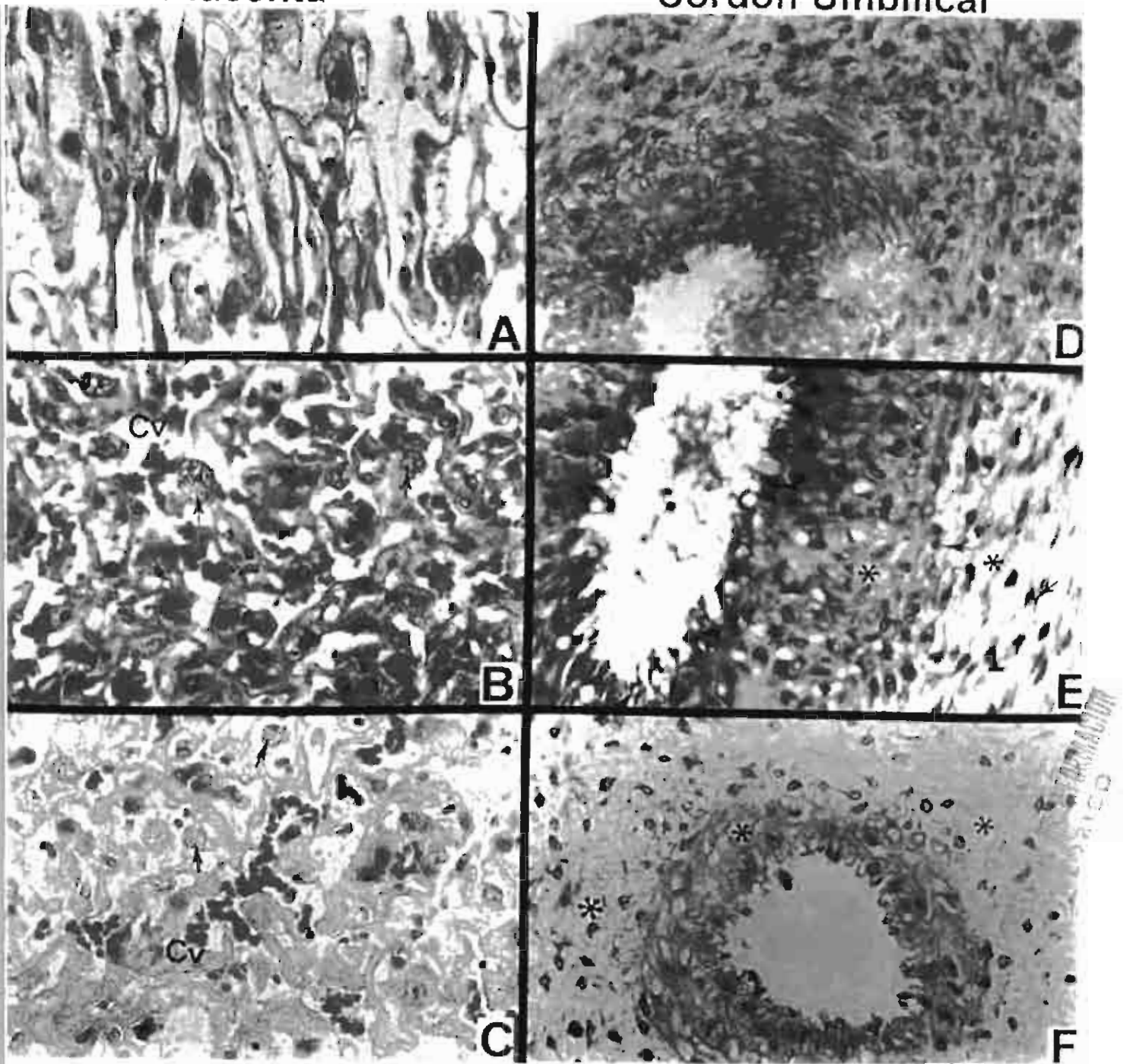


Figura 13. A.- Apariencia normal de la placenta y D.- cordón umbilical del grupo control, B.- Placenta del grupo tratado con 160 ppm de acetato de Pb, hay congestión vascular severa (Cv) con vacuolización citoplásmica (↑), C.- Placenta del grupo expuesto a 320 ppm de acetato de Pb la mayoría de las células presentan desintegración de la cromatina (◊) y congestión vascular severa (Cv), E.- En cordón umbilical del grupo tratado con 160 ppm de acetato de Pb, hay células hypercromáticas y retraídas (↑) con edema intersticial severo (*), F.- El cordón umbilical del grupo expuesto a 320 ppm de acetato de Pb, muestra edema intersticial severo (*) (H-E, 40 X).

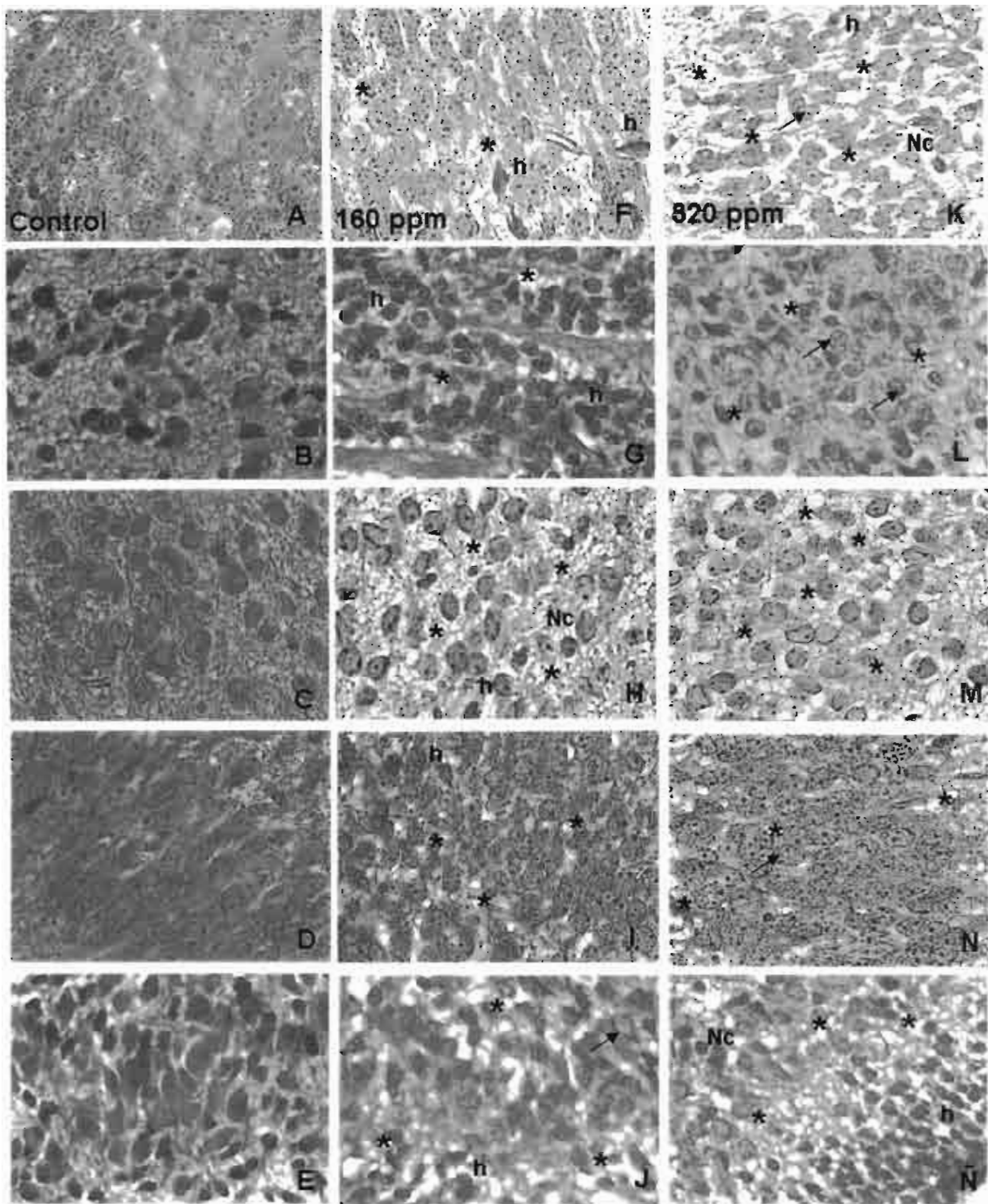


Fig. 14. **A)** Corteza parietal (Cx) , **B)** Estríado (E), **C)** Talamo (T), **D)** Hipocampo (Hp) y **E)** Cerebelo (Ce) de fetos del grupo control, mostrando la apariencia normal de las células. **F)** Cx, **G)** E, **H)** T, **I)** Hp y **J)** Ce, de fetos del grupo expuestos a 160 ppm, muestran pocas células hiper cromáticas (**h**) y pocos núcleos condensados (Nc), desintegración de la cromatina ($\hat{\uparrow}$) y edema intersticial (*). **K)** Cx, **L)** E, **M)** T, **N)** Hp, **Ñ)** Ce, de fetos del grupo tratado con 320 ppm, las lesiones son más intensas y edema intersticial severo (*), (Doble Impregnación de Río-Hortega, 20 X) y (H-E, 20 X.)

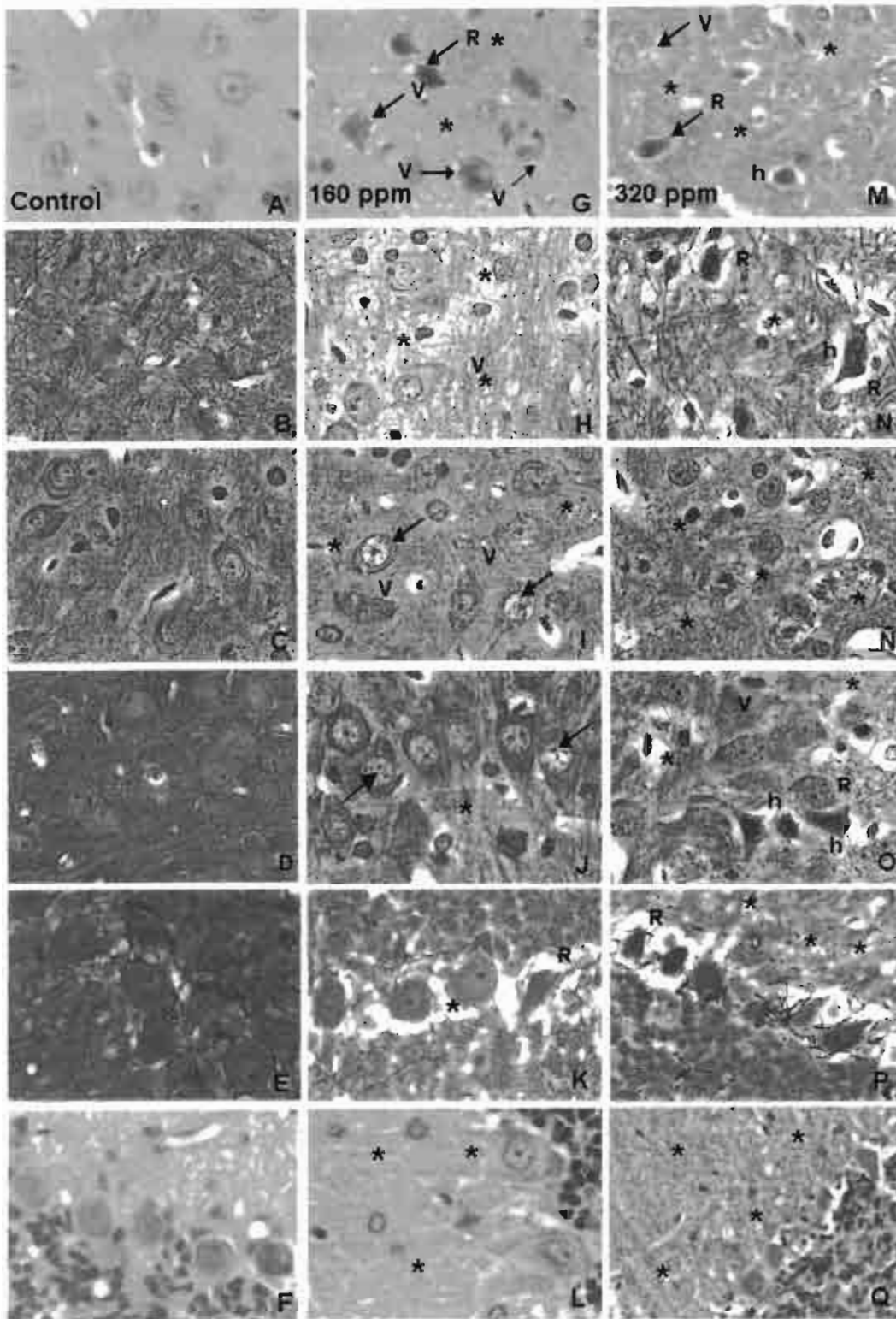


Fig. 15. **A)** Corteza parietal (Cx) , **B)** Estriado (E), **C)** Talamo (T), **D)** Hipocampo (Hp), **E)** y **F)** Cerebelo (Ce de ratas de 45 días de edad, mostrando la apariencia normal de las células. **G)** Cx. , **H)** E, **I)** T, **J)** Hp. **K)** y **L)** Ce, de ratas tratadas con 160 ppm de acetato de Pb mostrando varias células hiper cromáticas (h), hay vacuolización (V) y retracción nucleosomática R, desintegración de la cromatina (↑), edema intersticial (*). **M)** Cx, **N)** E, **Ñ)** T , **O)** Hp, **P)** y **Q)** Ce de ratas tratadas con 320 ppm presentan las mismas lesiones pero más intensas y edema intersticial severo (*). (Doble Impregnación de Río-Hortega, 40 X) y (H-E, 40 X.)

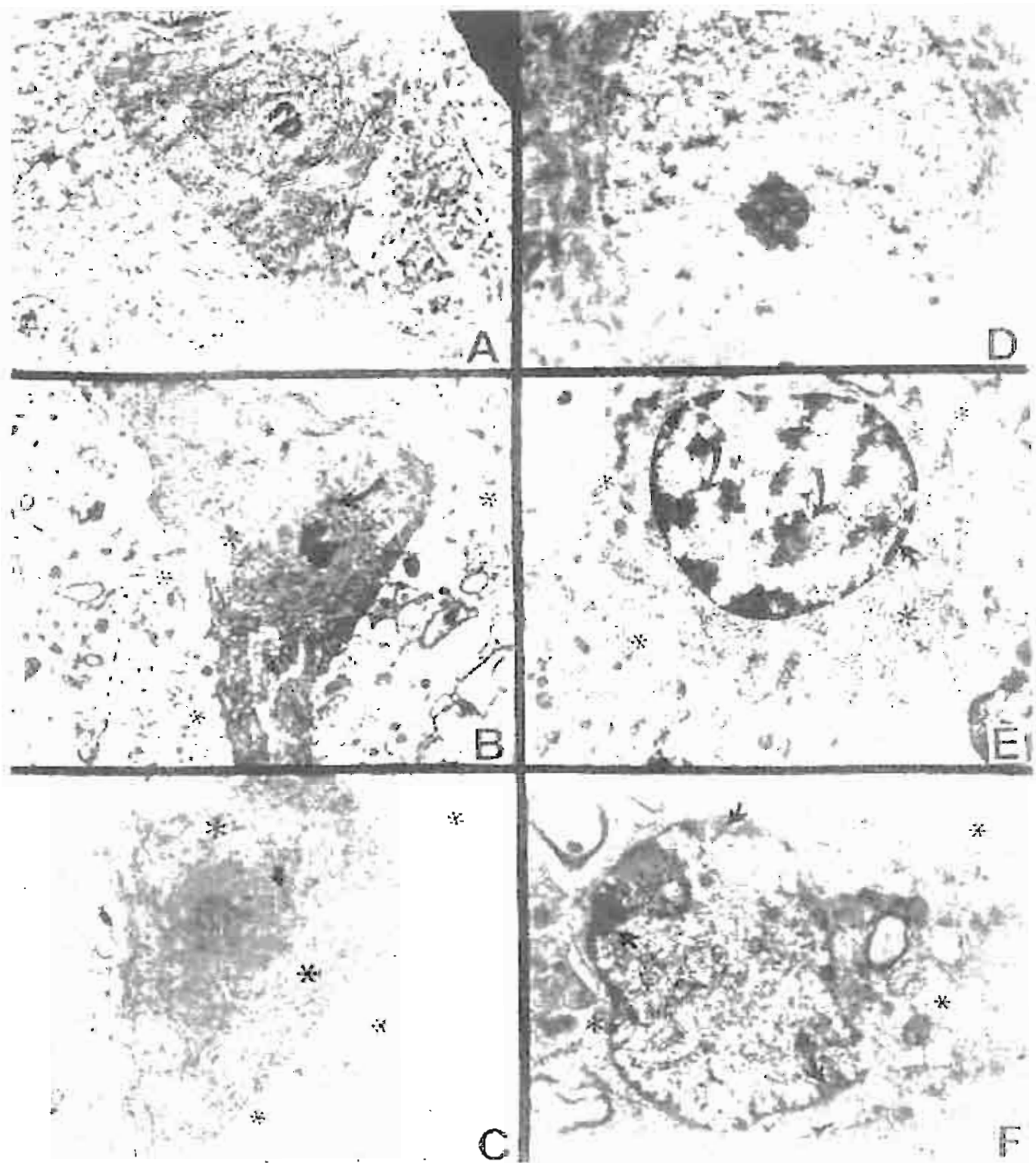


Figura 16. Microscopía electrónica de neuronas de corteza parietal (Cx) y estriado (E) de ratas de 45 días de edad. A-D.- Aspecto normal de las neuronas de Cx y E del grupo control. B-C.- Corteza de los grupos tratados con 160 y 320 ppm de acetato de Pb, mostrando vesículas electrodensas de cromatina y cromatina marginal condensada (Ⓢ) y edema intra y extracelular (*). E-F.- Estriado de ratas tratadas con 160 y 320 ppm mostrando las mismas alteraciones como las observadas en corteza (A,B,C, 7500 X y D,E,F 19000 X).

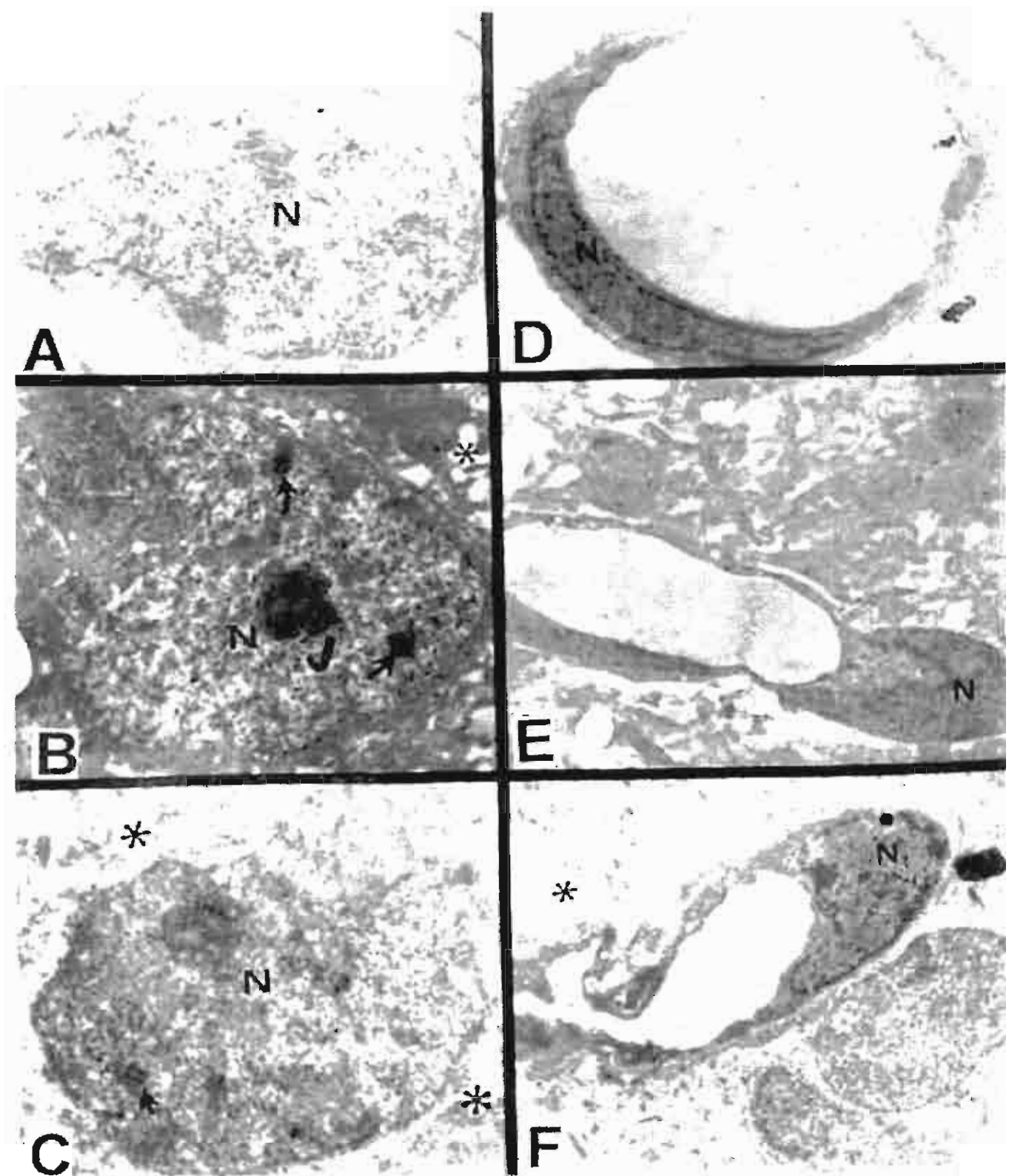


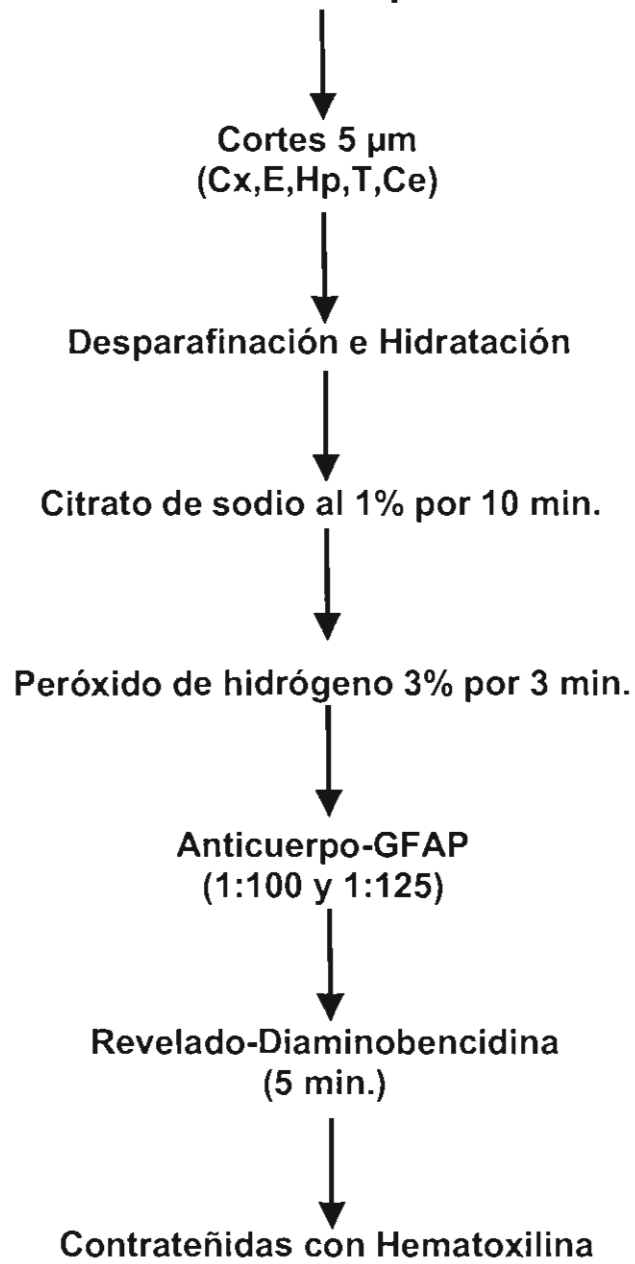
Figura 17. Microscopia electrónica de neuronas y células endoteliales. A-D.- Apariencia normal de neuronas y células endoteliales de fetos del grupo control. B-E.- Neuronas y células endoteliales de fetos del grupo tratado con 160 ppm de acetato de Pb, mostrando granulos electrodensos de cromatina (↑) y edema intracelular (*), en células endoteliales no se observan cambios. C-F.- Neuronas y células endoteliales de fetos del grupo expuesto a 320 ppm. Se observan las mismas lesiones que el grupo anterior (19000 X).

6.4 Resultados Inmunohistoquímicos.

HIPOTESIS III

Si el Plomo es un tóxico que no solo afecta la población neuronal, si no también a la población astrocítica, induciendo un desarrollo precoz astrogial y puede acelerar su maduración. Entonces encontraremos incrementados los niveles de GFAP en todas las regiones cerebrales estudiadas.

Inmunohistoquímica



En los fetos del grupo control se observó mínima inmunoreactividad de GFAP en todas las regiones estudiadas.

En las regiones de los fetos después del tratamiento con 160 ppm de acetato de lomo, se observó un aumento en la inmunoreactividad GFAP en todas las regiones (corteza parietal, estriado, hipocampo, tálamo y cerebelo). Mientras tanto en el grupo que fue tratado con 320 ppm se observó una mayor reactividad principalmente en corteza, cerebelo e hipocampo (Figs. 18).

En las diferentes regiones cerebrales de las ratas de 45 días de edad del grupo control se observa poca inmunoreactividad. En tanto que en las regiones de las ratas que recibieron el tratamiento de 160 ppm, se observó reactividad en todas las regiones siendo más evidente en corteza, hipocampo y cerebelo. El grupo que fue tratado con 320 ppm la reactividad observada fue mayor que en los grupos anteriores (Fig. 19).

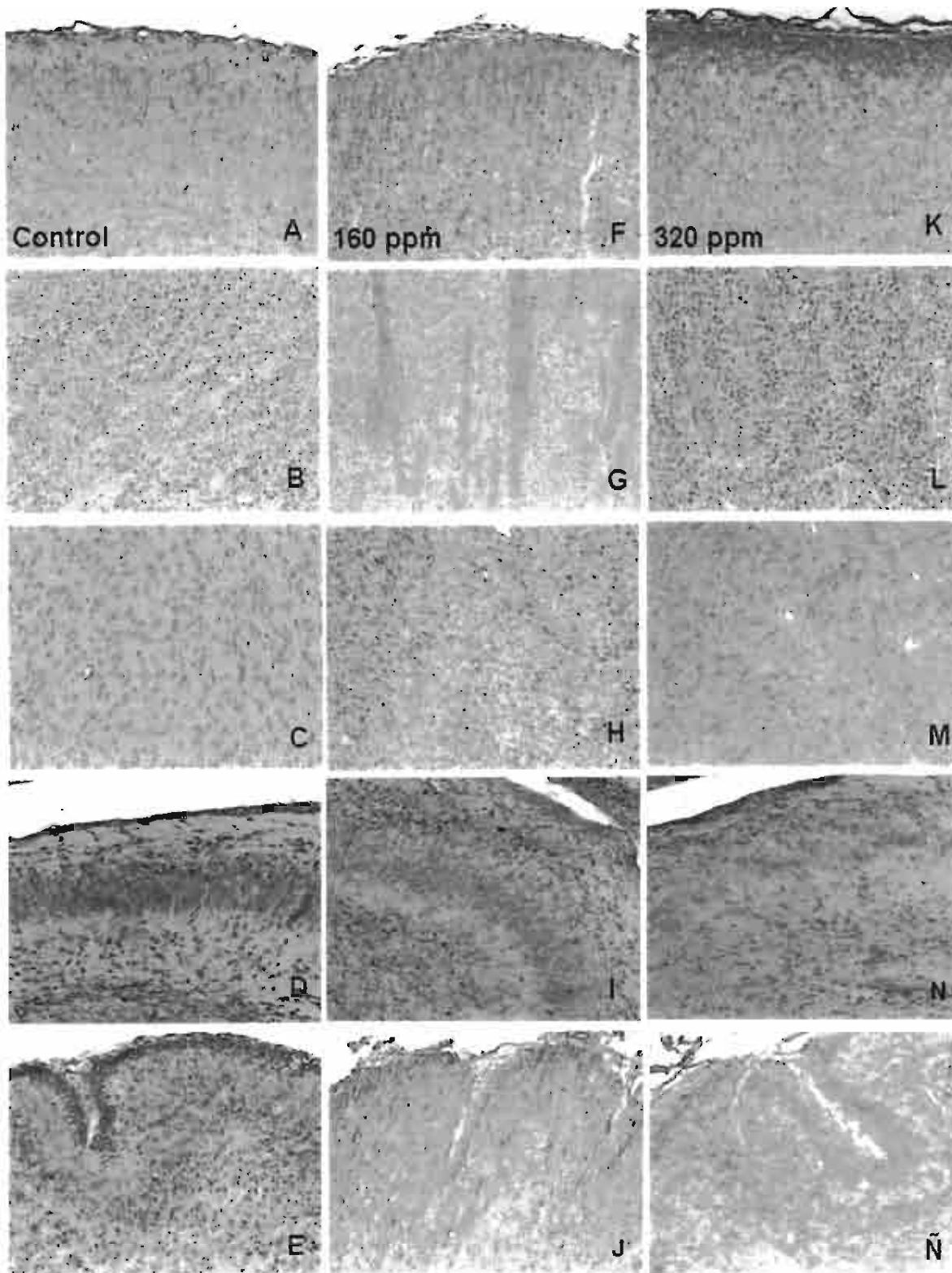


Figura 18. A) Corteza parietal (Cx) , B) Estriado (E), C) Talamo (T), D) Hipocampo (Hp) y E) Cerebelo (Ce) de fetos del grupo control, se observa mínima inmunoreactividad en todas las regiones estudiadas. F) Cx, G) E, H) T, I) Hp y J) Ce, de fetos del grupo expuesto a 160 ppm, muestran alta reactividad de GFAP. K) Cx, L) E, M) T, N) Hp, Ñ) Ce de fetos del grupo tratado con 320 ppm, se observa mayor reactividad de GFAP. (Método PAP, contra GFAP, 20X).

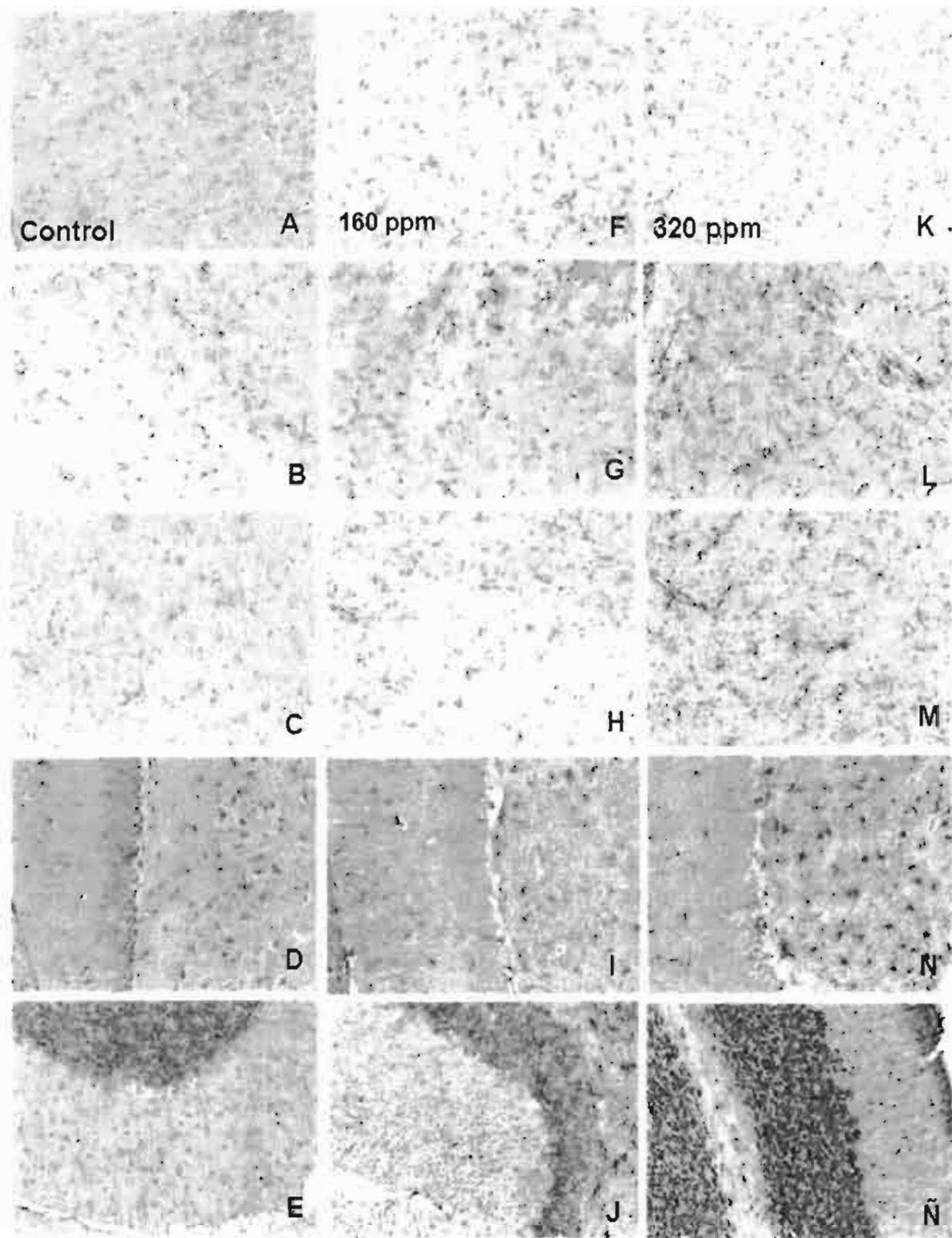


Figura 19. A) Corteza parietal (Cx) , B) Estriado (E), C) Talamo (T), D) Hipocampo (Hp) y E) Cerebelo (Ce) de ratas de 45 días de edad del grupo control, mostrando poca reactividad de GFAP. F) Cx, G) E, H) T, I) Hp y J) Ce, de ratas del grupo tratado con 160 ppm. K) Cx, L) E, M) T , N) Hp, Ñ) Ce, ratas tratadas del grupo tratado con 320 ppm, ambos grupos presentan mayor reactividad. (Método PAP, contra GFAP, 20X.)

6.5 Resultados Morfométricos

HIPOTESIS IV

Si el Plomo genera muerte celular extensa, entonces en el análisis cuantitativo automatizado se observará disminución en el tamaño y el número celular, así como edema intersticial en las diferentes regiones estudiadas.

Análisis Morfométrico

(Leica IM1000, Computadora Pentium III,
Microscopio M-DMLS y cámara digital Hiper HA.)



5 Laminillas de Cx,E,Hp,T y Ce



**5 campos de cada región
(de 20X y 40 X)**



Digitalizador de Imágenes
(Número de Células Alteradas, tamaño
de neuronas y núcleos, edema intersticial)

La tabla 13 muestra el número total de células por campo en Cx, E, T, Hp, y Ce de ratas de 21 días de gestación cuando se administraron con diferentes dosis de acetato de plomo . Se encontró una disminución en el número total de células de 12,23,12,31,y 28% en el grupo tratado con 160 ppm, y el grupo que recibió una concentración de 320 ppm se observaron disminuciones de 37,49,33,34 y 30% en comparación con los promedios de los respectivos controles, con diferencias significativas de $p < 0.05$ (Fig. 20).

Tabla 13.- Efecto del Pb sobre el número total de células en diferentes regiones del encéfalo de ratas de 21 días de gestación

	Cx	E	T	Hp	Ce
CONTROL	128.66±5.5	140.4±6.8	101.2±2.7	142.16±6	142.28±4.7
160 ppm	113.46±3.1	108.13±3.9	89.2±4.1	98.53±2.8	102.37±3
320 ppm	81.06±4	72.06±5.6	68±3.7	93.4±4.2	99.58±5.4

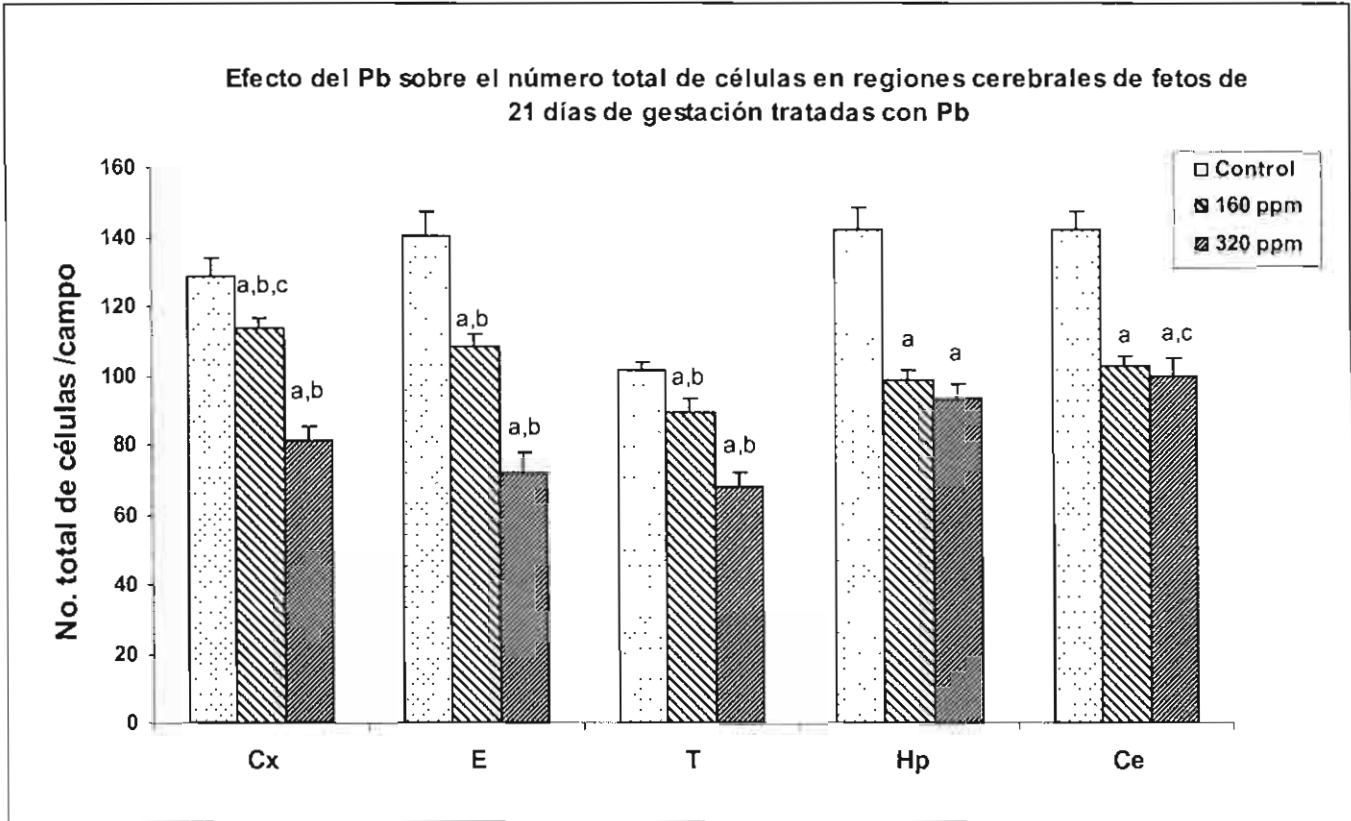


Figura 20. Número total de células por campo en Cx, E, T, Hp y Ce de fetos de ratas expuestas a 160 y 320 ppm de acetato de Pb en el agua de bebida durante 21 días de gestación. Valores promedio \pm error estándar de 5 campos por laminilla (5 laminillas /región/rata) a = $p < 0.05$ diferente VS control; b = $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm; c = $p < 0.05$ diferente vs regiones. ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

□

La tabla 14 muestra el número de células sanas por campo en Cx, E, T, Hp y Ce de ratas de 21 días de gestación cuando se administraron con diferentes dosis de acetato de plomo. Se encontró una disminución del número de células sanas de 29.2,43.3,20.6,14.3 y 57.4% . En el grupo tratado con 320 ppm se observaron disminuciones de 39.6, 71.5, 53.9, 55.8, 64.2 % en comparación con los promedios de los respectivos controles, con diferencias significativas de $p < 0.05$ (Fig. 21).

Tabla 14. Efecto del Pb sobre el número de las células sanas en diferentes regiones cerebrales de ratas de 21 días de gestación

	Cx	E	T	Hp	Ce
CONTROL	120.2±5.26	135±6.6	111±2.2	130.5±3.58	129.5±2.4
160 ppm	63.7±4.4	60±5.4	58.8±2.0	74.6±2.0	50.2±2.2
320 ppm	54.6±2.0	30.12±3.0*	34.12±3.6	48.6±3.4	44±3

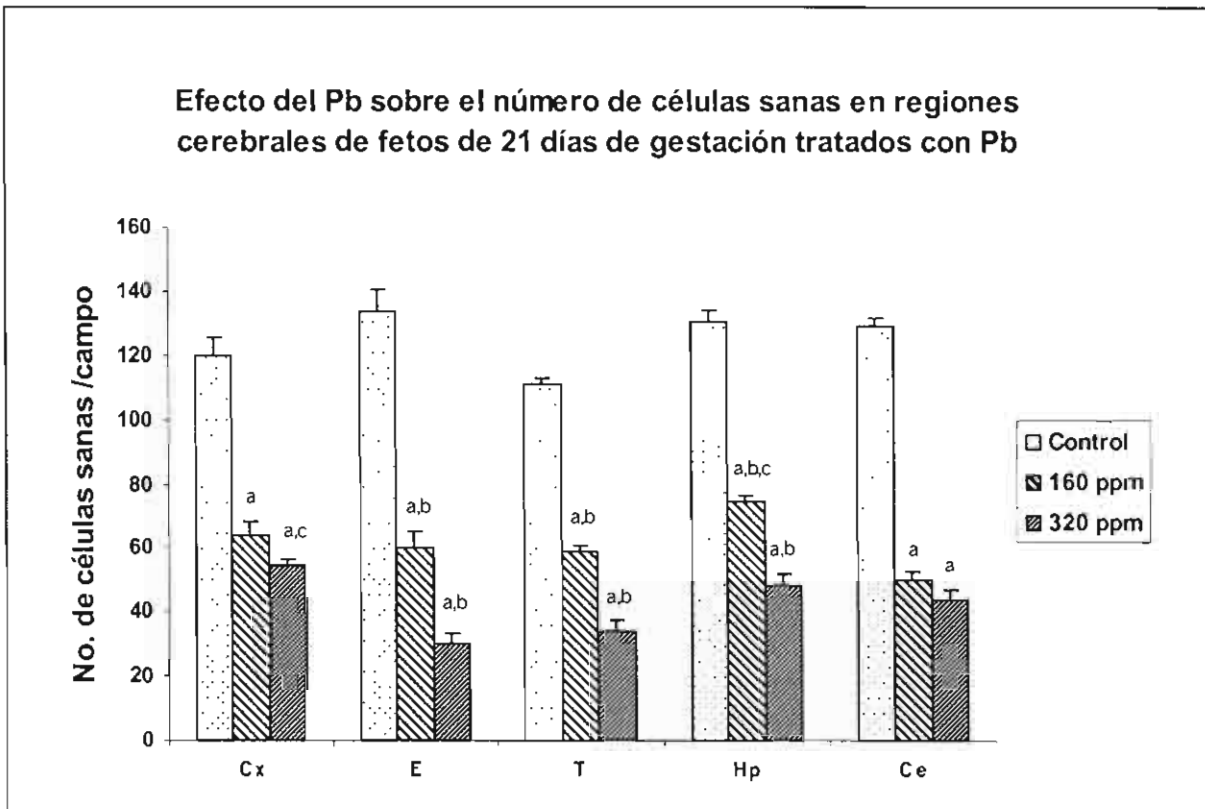


Figura 21.- Número de células sanas por campo en Cx, E, T, Hp y Ce de fetos de ratas expuestas a 160 y 320 ppm de acetato de Pb en el agua de bebida durante 21 días de gestación : Valores promedio \pm error estandar de 5 campos por laminilla (5 laminillas /por región/rata) a = $p < 0.05$ diferente vs control; b = $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm; c = $p < 0.05$ diferente vs regiones. ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

La tabla 15 muestra el número de células dañadas por campo en Cx, E, T, Hp, y Ce de ratas de 21 días de gestación cuando se administraron diferentes dosis de acetato de plomo. Se encontró un aumento de 90, 135, 172, 59, y 183% en el grupo tratado con 160 ppm, y en el grupo expuesto a 320 ppm se observaron incrementos de 219,259, 619, 267, y 232 % en comparación con los promedios de los respectivos controles, con diferencias significativas de $p < 0.05$ (Fig.22).

Tabla 15. Efecto del Pb sobre el número de células dañadas en diferentes regiones cerebrales de ratas de 21 días de gestación

	Cx	E	T	Hp	Ce
CONTROL	0.4±0.054	0.5±0.035	0.2±0.024	0.4±0.01	0.4±0.03
160 ppm	42±2.0	37.5±2.6	33±2.7	22±1.2	40±1.6
320 ppm	28.12±1.6	37.36±1.4	34.8±2.2	50.7±3.6	45.9±2.4

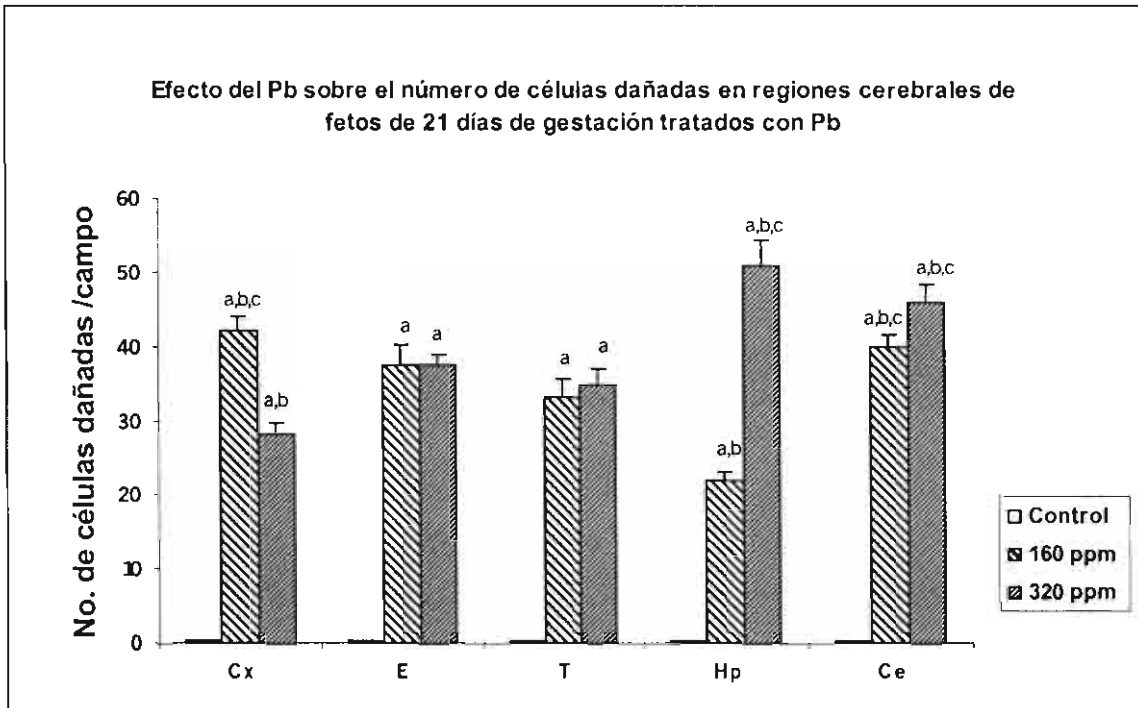


Figura 22.- Número de células dañadas por campo en Cx, E, T, Hp y Ce de fetos de ratas expuestas a 160 y 320 ppm de acetato de Pb en el agua de bebida durante 21 días de gestación : Valores promedio \pm error estándar de 5 campos por laminilla (5 laminillas/región/rata) a = $p < 0.05$ diferente vs control; b = $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm; c = $p < 0.05$, diferente vs regiones. ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

La tabla 16 muestra el número total de células por campo en Cx, E, T, Hp, y Ce de ratas de 45 días de edad, cuando se administraron diferentes dosis de acetato de Pb. Se encontró una disminución en el número de células de 62, 35, 52, 8, y 23% en el grupo tratado con 160 ppm y al grupo que se le administró una concentración de 320 ppm se observaron disminuciones de 63, 55, 56, 42, y 28% en comparación con los promedios de los respectivos controles, con diferencias significativas de $p < 0.05$ (Fig. 23).

Tabla 16. Efecto del Pb sobre el número total de células por campo en diferentes regiones cerebrales de ratas de 45 días de edad

	Cx	E	T	Hp	Ce
CONTROL	74.53±6	64.78±3.1	60.37±3.35	61.88±3.18	8.72±1.13
160 ppm	28.66±1.8	42.13±2.5	29.2±1.2	57.12±3.5	6.7±1.08
320 ppm	27.66±2.7	29.12±.95	26.33±1.7	35.73±2.7	6.2±.09

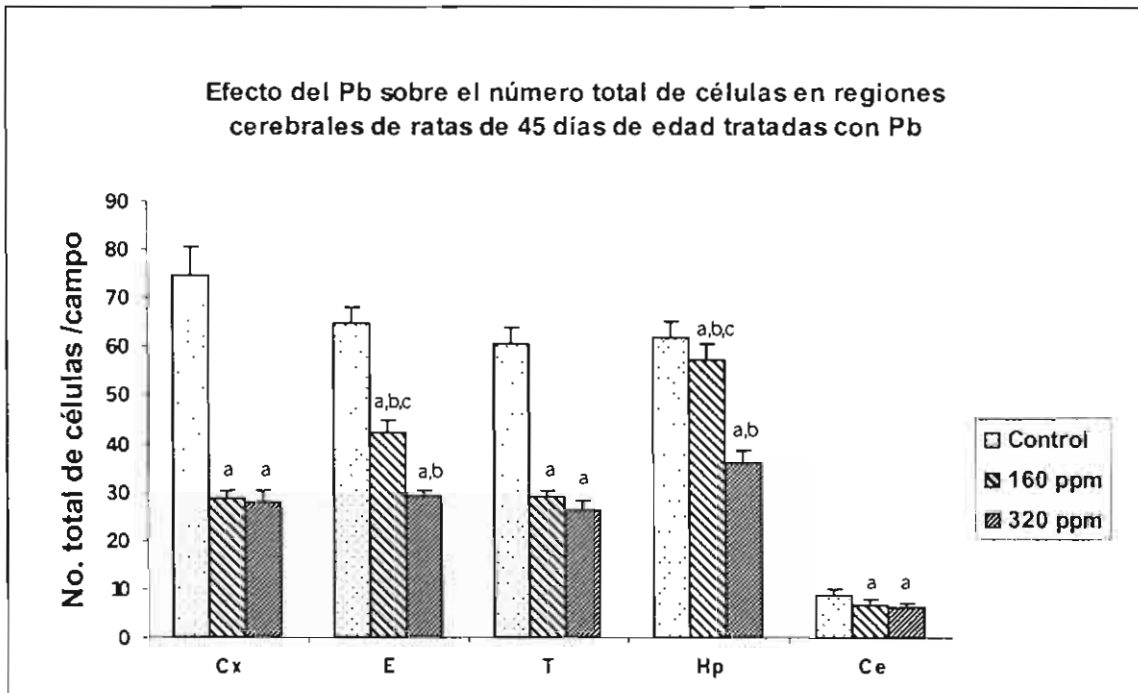


Figura 23.- Número total de células por campo en Cx, E, T, Hp y Ce de ratas de 45 días de edad expuestas a 160 y 320 ppm de acetato de Pb desde el 1° día de la gestación. Valores promedio \pm error estandar de 5 campos por laminilla (5 laminillas /región/rata) a = $p < 0.05$ diferente vs control; b = $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm; c = $p < 0.05$ diferente vs regiones. ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

La tabla 17 muestra el número de células sanas por campo en Cx, E, T, Hp y Ce de ratas de 45 días de edad cuando se administraron con diferentes dosis de acetato de plomo. Se encontró una disminución en el número de células sanas de 70, 22, 52.2, 17.5, 58.9% en el grupo tratado con 160 ppm y al grupo que se le administró una concentración de 320 ppm se observaron disminuciones de 77.8, 72.9, 68.9, 68.6 y 66% en comparación con los promedios de los respectivos controles, con diferencias significativas de $p < 0.05$ (Fig 24).

Tabla 17. Efecto del Pb sobre el número de células sanas en diferentes regiones cerebrales de ratas de 45 días de edad.

	Cx	E	T	Hp	Ce
CONTROL	72±7.5	64±4.7	55±4.9	61.9±4.8	7±3.5
160 ppm	16.2±2	29.7±2.8	15.3±1.6	30.6±2.8	4.2±0.75
320 ppm	8±0.66	16.4±1.3	6.92±0.76	17±1.28	3.4±0.41

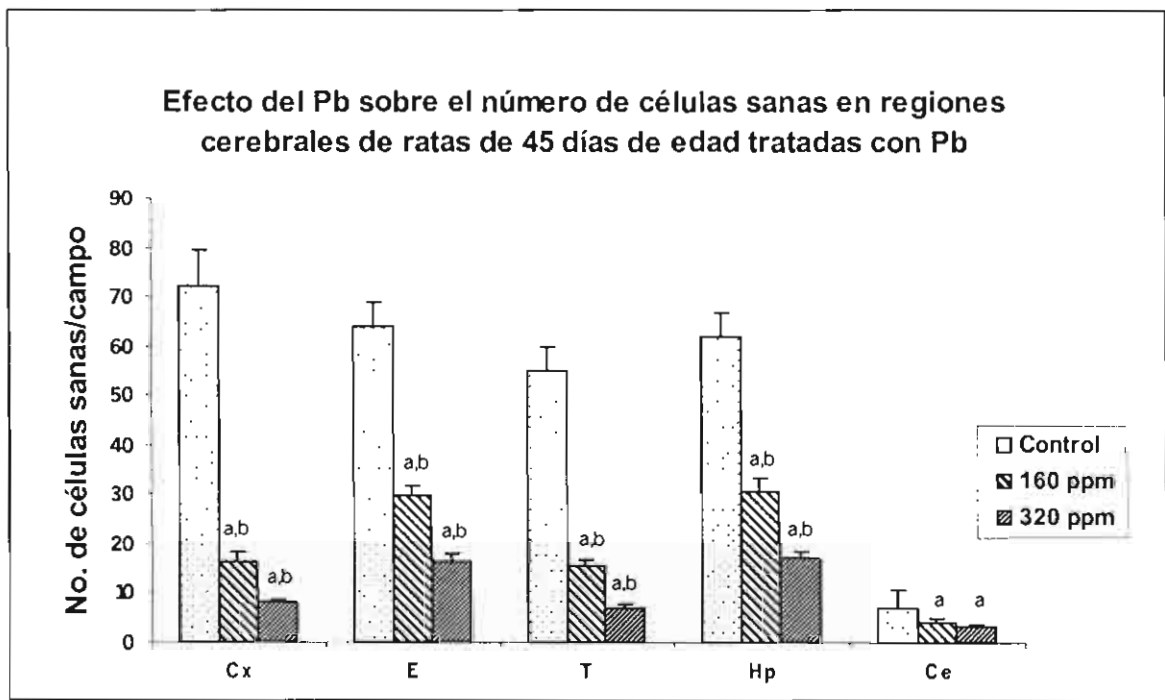


Figura 24.- Número de células sanas por campo en Cx, E, T, Hp, Ce de ratas de 45 días de edad expuestas a 160 y 320 ppm de acetato de Pb desde el 1° día de la gestación. Valores promedio \pm error estandar de 5 campos por laminilla (5 laminillas /región/rata) a = $p < 0.05$ diferente vs control; b = $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm. ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

La tabla 18 muestra El número de células dañadas por campo en Cx, E, T, Hp y Ce de ratas de 45 días de edad cuando se administraron con diferentes dosis de acetato de plomo. Se encontró un aumento de 500, 114.2, 227.5, 281.6 y 900% en el grupo tratado con 160 ppm y al grupo que se le administró una concentración de 320 ppm se observaron incrementos de 700, 414.2, 682.5, 411.4, 1852.3% en comparación con los promedios de los respectivos controles, con diferencias significativas de $p < 0.05$ (Fig. 25).

Tabla 18. Efecto del Pb sobre el número de células dañadas por campo en diferentes regiones cerebrales de ratas de 45 días de edad.

	Cx	E	T	Hp	Ce
CONTROL	0.16±0.03	0.35±0.060	0.24±0.52	0.26±0.014	0.08±0.026
160 ppm	12±0.66	9.6±0.82	11.7±1.5	15±1.08	4.2±0.75
320 ppm	16±0.78	18±1.4	18.7±1	13.4±1	8.2±0.38

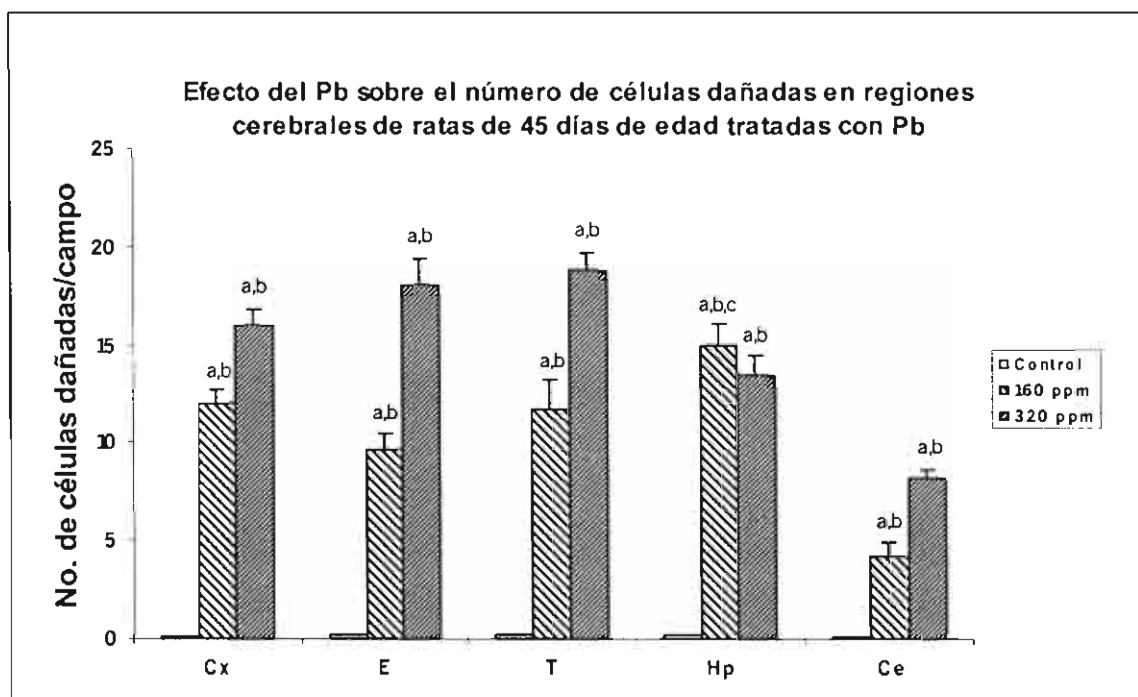


Figura 25.- Número de células dañadas por campo en Cx, E, T, Hp y Ce de ratas de 45 días de edad expuestas a 160 y 320 ppm desde el 1° día de la gestación. Valores promedio \pm error estándar de 5 campos por laminilla (5 laminillas/región/rata) a = $P < 0.05$ diferente vs control; b = $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm; c = $p < 0.05$ diferente vs regiones. ANOVA seguida de la prueba de tukey.

Tabla 19 muestra el tamaño de las células de Cx, E, T, Hp y Ce de ratas de 45 días de edad cuando se administraron con diferentes dosis de acetato de plomo. Se encontró una disminución de 38, 15, 20, 21 y 20% en el grupo con tratamiento de 160 ppm y el grupo que recibió una concentración de 320 ppm se observaron disminuciones de 34, 29, 21, 26 y 28 % en comparación con los promedios de los respectivos controles, con diferencias significativas de $p < 0.05$ (Fig. 26).

Tabla 19. Efecto del Pb sobre el tamaño de las células en diferentes regiones cerebrales de ratas de 45 días de edad

	Cx	E	T	Hp	Ce
CONTROL	73.47±3.37	70.75±1.5	74.18±1.9	92.98±0.4	78.04±2.2
160 ppm	53.39±1.9 *	60.19±3.7 *	59.62±2.2 *	73.87±1.9 *	62.4±1.4 *
320 ppm	48.83±2.4 *	50.7±1.3 *	58.59±2 *	68.64±1.6 *	56.47±1.5 *

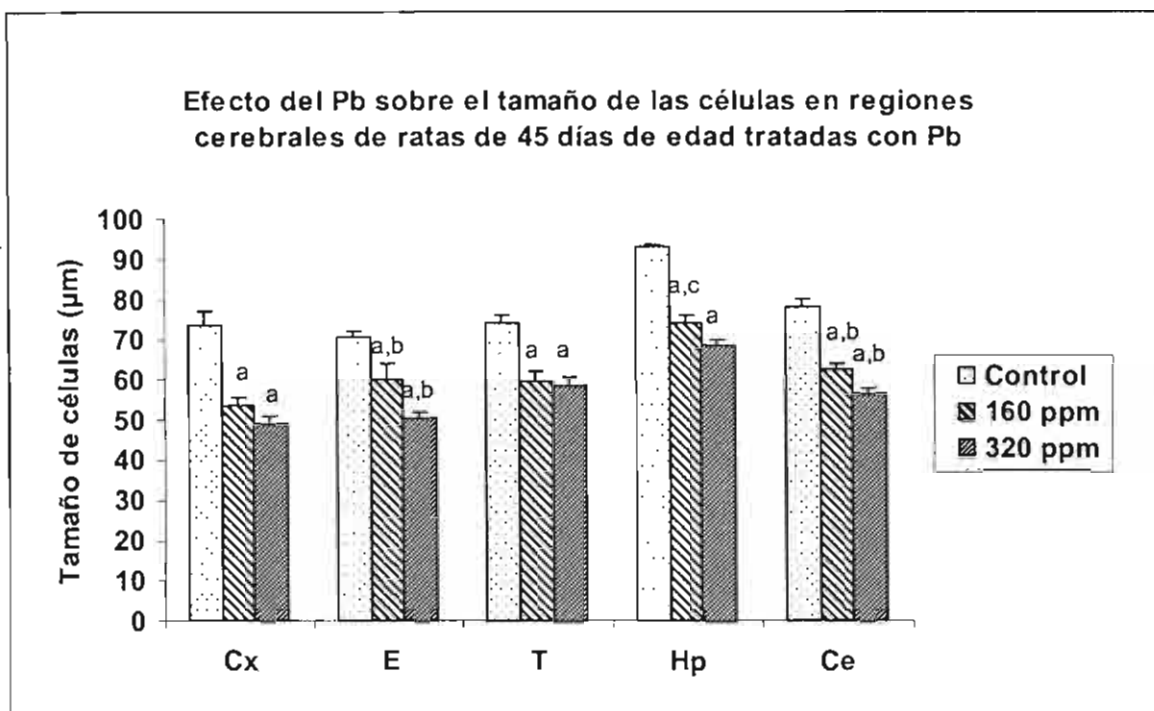


Figura 26.- Tamaño de células por campo en Cx, E, T, Hp y Ce de ratas de 45 días de edad expuestas a 160 y 320 ppm de acetato de Pb desde el 1° día de la gestación. Valores promedio \pm estándar de 5 campos por laminilla (5 laminillas/región/rata) a = $p < 0.05$ diferente vs control; b = $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm; c = $p < 0.05$ diferente vs regiones. Anova seguida de la prueba de Tukey.

La tabla 20 muestra el tamaño de los núcleos de células de Cx, E, T, Hp y Ce de ratas de 45 días de edad cuando se administraron con diferentes dosis de acetato de plomo. Se encontró una disminución de 18, 17, 16, 12 y 26% en el grupo con tratamiento de 160 ppm y el grupo que recibió una concentración de 320 ppm se observaron disminuciones de 28,25,20,17,33% en comparación con los promedios de los respectivos controles, con diferencias significativas de $p < 0.05$ (Fig.27).

Tabla 20. Efecto del Pb sobre el tamaño de los núcleos de las células de diferentes regiones cerebrales de ratas de 45 días de edad

	Cx	E	T	Hp	Ce
CONTROL	38.27±0.9	41.8±1.25	43.6±0.8	54.76±1.5	46.93±2
160 ppm	31.25±1	34.8±0.9	36.55±0.7	48.19±0.7	34.75±0.83
320 ppm	27.4±1	31.44±0.9	34.67±1.2	45.68±1.6	31.38±0.9

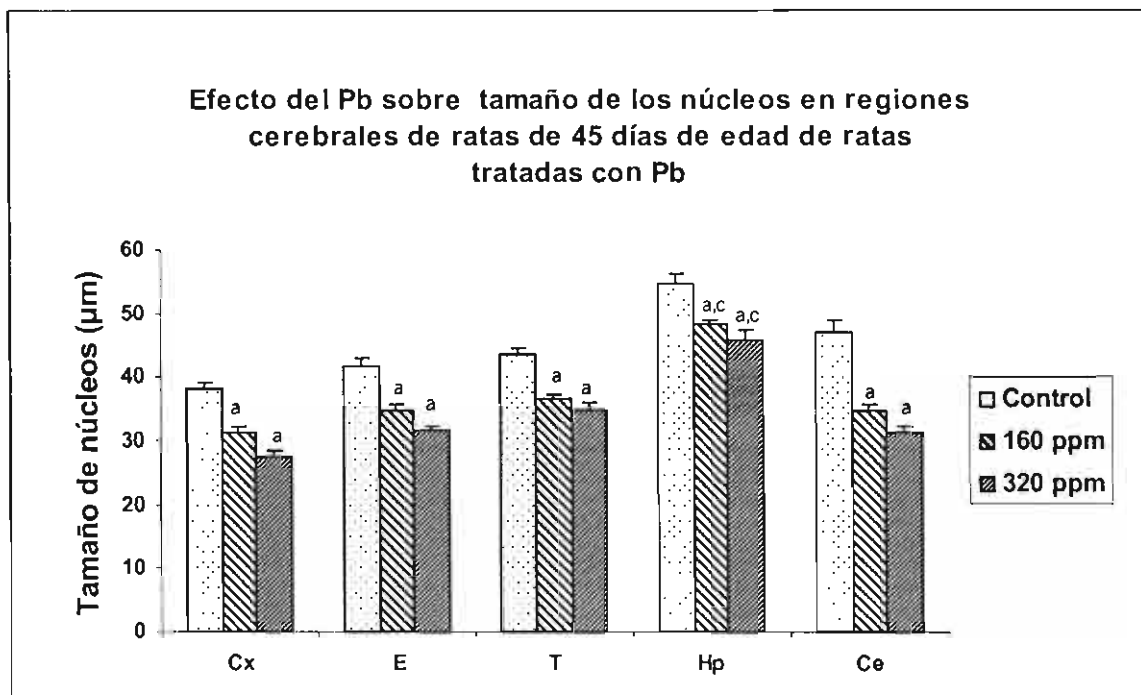


Figura 27.- Tamaño de los núcleos por campo en Cx, E, T, Hp y Ce de ratas de 45 días de edad expuestas a 160 y 320 ppm de acetato de Pb desde el 1° día de la gestación. Valores promedios \pm error estándar de 5 campos por laminilla (5 laminillas/región/rata) a = $p < 0.05$ diferente vs control; c = $p < 0.05$ diferente vs regiones. ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

La tabla 21 muestra el número de astrocitos por campo en Cx, E, T, Hp y Ce de ratas de 45 días de edad cuando se administraron dos diferentes dosis de acetato de plomo. Se encontró un aumento de 74,109, 33,75 y 128% en el grupo tratado con 160 ppm y el grupo que recibió una concentración de 320 ppm se observaron incrementos de 143, 166, 103, 153 y 320% en comparación con los promedios de los respectivos controles, con diferencias significativas de $p < 0.05$ (Fig. 28).

Tabla 21. Efecto del Pb sobre el número de astrocitos por campo en diferentes regiones cerebrales de ratas de 45 días de edad.

	Cx	E	T	Hp	Ce
CONTROL	18.86±0.6	20.4±1.2	26.25±0.9	38.06±2.7	20.8±1.4
160 ppm	32.73±1.4	42.73±2.6	34.79±1.9	66.66±1.4	47.33±3.9
320 ppm	45.8±1.4	54.33±3.2	53.33±2.2	96.33±2.4	87.33±2.6

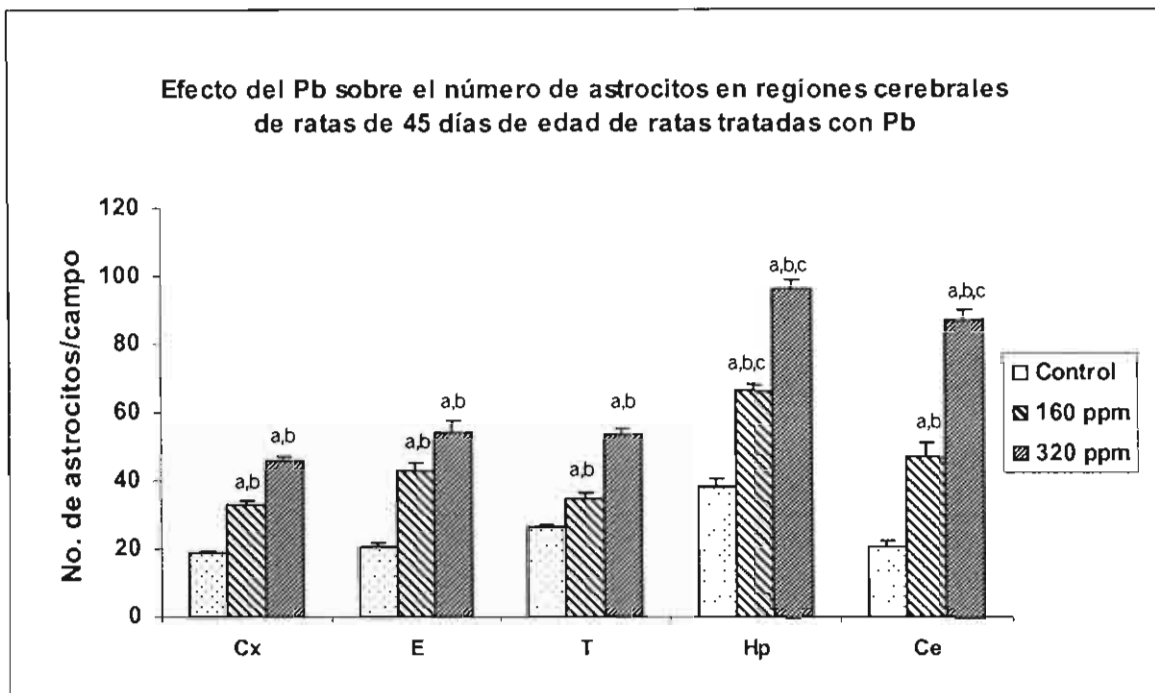


Figura 28.- Número de astrocitos por campo en Cx, E, T, Hp y Ce de ratas de 45 días de edad expuestas a 160 y 320 ppm de acetato de Pb desde el 1° días de la gestación. Valores promedio \pm error estandar de 5 campos por laminilla (5 laminillas/región/rata) a = $p < 0.05$ diferente vs control; b = $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm. ANOVA seguida de la prueba de Tukey

La tabla 22 muestra el edema intersticial en Cx, E, T, Hp y Ce de ratas de 21 días de gestación, cuando se administraron con diferentes dosis de acetato de plomo. Se encontró un incremento de 52, 41, 36, 16 y 59 veces en el grupo tratado con 160 ppm y el grupo que recibió una concentración de 320 ppm se observaron incrementos de 68, 64, 57, 38, y 62 veces en comparación con los promedios de los respectivos controles, con diferencias significativas de $p < 0.05$ (Fig. 29).

Tabla 22. Edema intersticial en diferentes regiones de ratas de 21 días de gestación.

	Cx	E	T	Hp	Ce
CONTROL	19.1±1.3	21.28±1-1	16.22±1.7	22.5±2.9	20.76±1.14
160 ppm	992.8±36.9	873.73±43.9	579.17±15.7	362.37±17.8	1220.5±41.8
320 ppm	1293±46.58	1364.9±112	918.79±20.8	861.5±20.3	1288.36±38.65

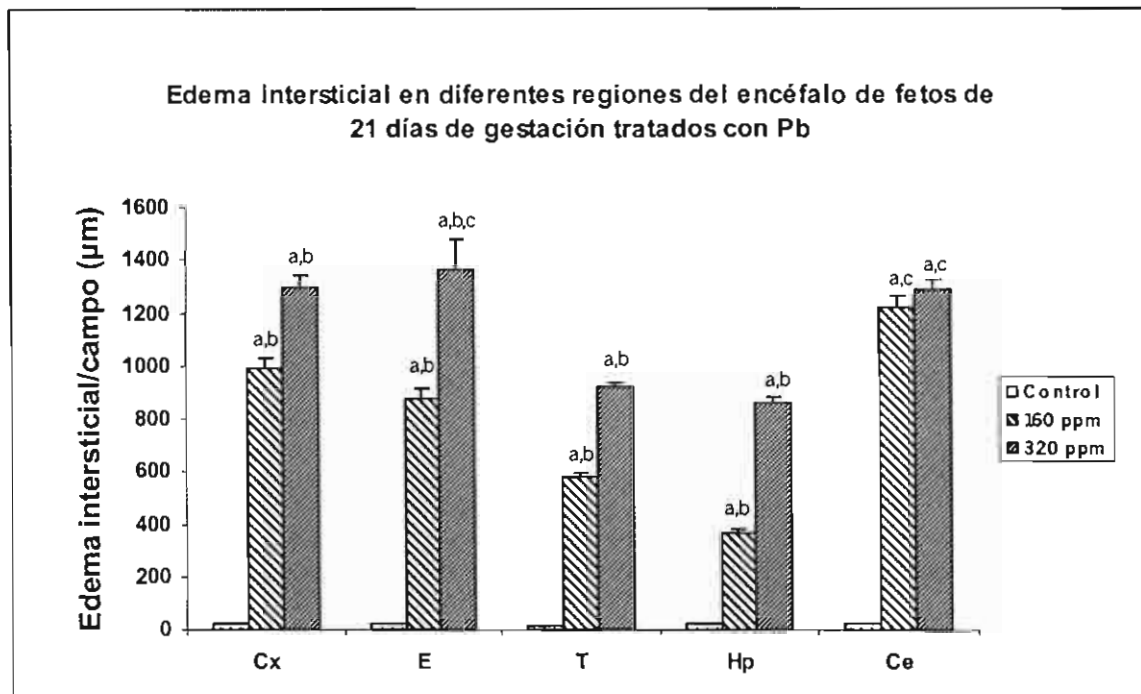


Figura 29.- Edema intersticial por campo en Cx, E, T, Hp y Ce de fetos de ratas expuestas a 160 y 320 ppm de acetato de Pb en la bebida. Valores promedio \pm error estándar de 5 campos por laminilla (5 laminillas/región/rata) a = $p < 0.05$ diferente Vs control; b = $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm; c = $p < 0.05$ diferente vs regiones. ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

La tabla 23 muestra el edema intersticial en Cx, E, T, Hp y Ce de ratas de 45 días de edad cuando se administraron con diferentes dosis de acetato de plomo. Se encontró un incremento de 69, 12, 44, 16 y 91 veces en el grupo tratado con 160 ppm y el grupo que recibió una concentración de 320 ppm se observaron incrementos de 74, 30, 70, 72 y 100 veces en comparación con los promedios de los respectivos controles, con diferencias significativas de $p < 0.05$ (Fig. 30).

Tabla 23. Edema intersticial en diferentes regiones de ratas de 45 días de edad

	Cx	E	T	Hp	Ce
CONTROL	13.7±1.7	24.76±2.4	13.55±1.9	16.92±1	13.06±1.2
160 ppm	939.3±60.6	293.9±13.7	589.6±36.6	265.9±18.7	1192.6±90
320 ppm	1009.8±40.44	732.8±24.6	944.1±49.2	1211.1±29.7	1317.8±40.4

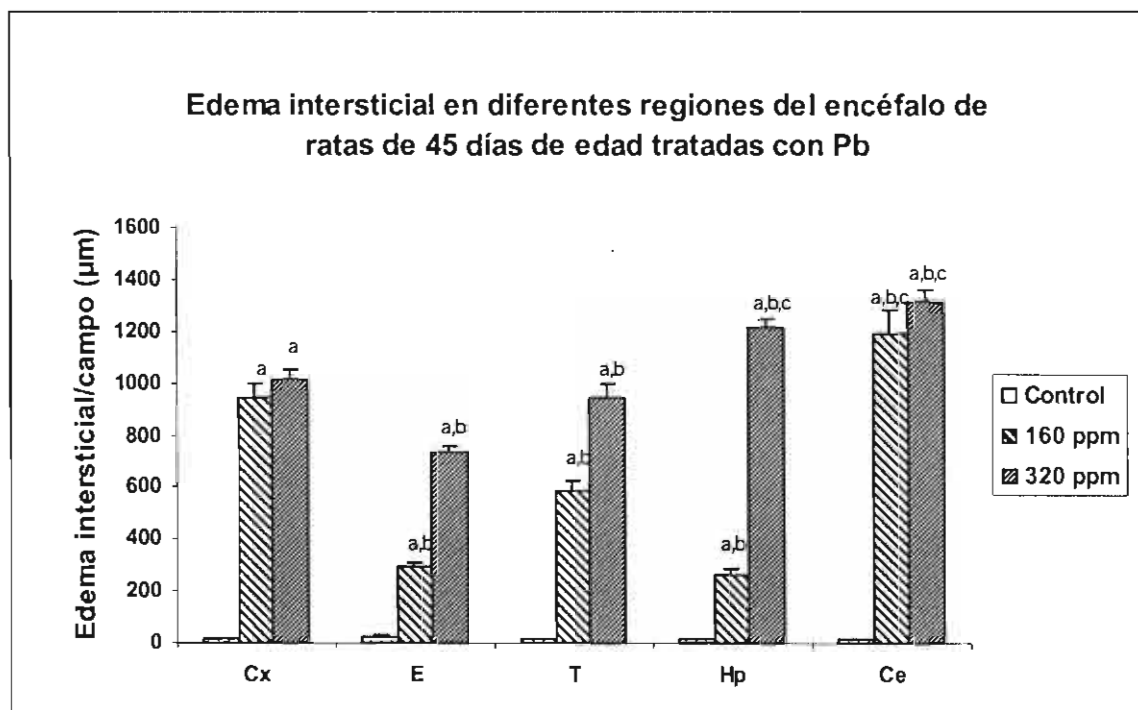


Figura 30. Edema Intersticial por campo en Cx, E,T, Hp y Ce de ratas de 45 días de edad expuestas a 160 y 320 ppm de acetato de Pb desde el 1° día de la gestación. Valores promedios \pm error estandar de 5 campos por laminilla (5 laminillas/región/por rata) a = $p < 0.05$ diferente vs control; b = $p < 0.05$, 160 ppm diferente vs 320 ppm; c = $p < 0.05$ diferente vs regiones. ANOVA seguida de la Prueba de Tukey.

VII *Discusión*

En el presente estudio se examinaron los efectos de la exposición de plomo en varias regiones del cerebro de fetos y ratas adultas con el objetivo de correlacionar los cambios patológicos en placenta y cordón umbilical con las alteraciones en el encéfalo.

De manera notable, se observó un incremento en la dosis-dependiente después del tratamiento en las ratas tratadas con 160 y 320 ppm de acetato de Pb, cuando se compararon con las ratas control. Las concentraciones de plomo en sangre solo reflejan el libre acceso y la cantidad del potencial tóxico que puede radicar en los órganos del cuerpo. Estos niveles de Pb en sangre fueron similares a los obtenidos en previos experimentos por (Claudio, 1997; García-Arenas 1999; Beate y col., 2000) y se sabe que son capaces de incrementar la lipoperoxidación en sangre (Gürer y col. 1998). El sistema hematológico es un importante blanco en la toxicidad por Pb, principalmente en la síntesis del grupo hemo que es alterada por concentraciones pequeñísimas de Pb (Gürer et al, 1998). En estudios anteriores muestran que la actividad de dehidratasa δ -aminolevulinato (ALAD), fue significativamente reducida hasta un 75% en los animales tratados, esto puede ser a la acumulación del ácido δ -aminolevulinico (Klassen, 1992; Gürer y col, 1998).

Los niveles de Pb encontrados en placenta se observaron por arriba de 60 μ gr/gr tejido húmedo (Tabla 2 y Fig. 6), mientras que en cordón los niveles

alcanzados fueron de 45 $\mu\text{g}/\text{gr}$ tejido húmedo. Estos resultados nos muestran que el Pb pasa por el cordón, pero no se acumula, sin embargo en la placenta es rápidamente absorbido y almacenado y esto se debe a que la placenta es rica en Zinc (Antonio y col. 1999), fierro y altas concentraciones de hemoglobina (Folch y col. 1985).

La intoxicación del Pb causa alteraciones en la barrera-hematoencefálica principalmente en el SNC inmaduro debido a que no lo protege contra xenobioticos (Antonio y col. 1999) y su efecto podría estar asociado con la presencia de pequeñas lesiones hemorrágicas y alteraciones focales en los vasos como un evento crucial en ratas recién nacidas (Sündstrom et al, 1983).

Los niveles de Pb se observaron altamente concentrados con pequeñas diferencias regionales en todas las áreas estudiadas (corteza, estriado, tálamo, hipocampo y cerebelo) de los fetos de 21 días de gestación con ambas dosis de acetato de Pb, alcanzando niveles arriba de 100 $\mu\text{g}/\text{gr}$ tejido húmedo, Sin embargo los niveles de Pb encontrados en las regiones del cerebro de ratas de 45 días de edad no alcanzan los 80 $\mu\text{g}/\text{gr}$ tejido húmedo. Estos resultados nos indican que el Pb pasa fácilmente la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica de los fetos, debido a que la barrera hematoencefálica esta completamente inmadura (Bellinger y col., 1992) lo que hace más sensible al encéfalo de los efectos tóxicos del Pb. Por otro lado también encontramos una significativa asociación entre el Pb en sangre y el Pb en las regiones cerebrales así como con el daño histopatológico

producido por Pb en el encéfalo de ratas de 45 días de edad (Tabla 1 y Fig. 5 y tabla 3 y Fig. 7). Nuestros resultados son similares a previos estudios que muestran una marcada acumulación de Pb en varias regiones del cerebro (Needleman, 1989).

El Pb estimula la lipoperoxidación en la sangre porque tienen altas concentraciones de oxígeno y la hemoglobina que puede ser oxidada fácilmente (Gürer et al, 1998) y por lo tanto los componentes de las células sanguíneas son vulnerables a la peroxidación de lípidos. En efecto el incremento de la peroxidación detectado en sangre (Tabla 9 y Fig. 5) de ratas tratadas con Pb en el presente estudio confirma previos estudios hechos por Gürer y col., 1998, y Hunaiti, y col., 2000;

Estudios hechos en animales han reportado que el plomo altera el metabolismo oxidativo y aumenta la peroxidación de lípidos directa o indirectamente en hígado, riñón y cerebro (Antonio et al, 1999) así como induce estrés oxidativo como un posible mecanismo para algunos efectos tóxicos del Pb (Gürer y col. 1998). Los productos fluorescentes se vieron acumulados en cordón umbilical con 481.5 U.F/mg proteína, mientras que en placenta fueron de 81.8 UF/mg proteína (Tabla 6 y Fig. 10). La baja acumulación de los productos fluorescentes lipídicos encontrados en placenta probablemente se deben a que esta tiene altas concentraciones de metalotioneína que es una proteína atrapadora de radicales libres (Antonio et al, 1999; Ham, 1984). Las alteraciones oxidativas encontradas en placenta y cordón umbilical podrían ser un buen marcador en este modelo para

estrés oxidativo. Nosotros encontramos que el Pb causa un dramático incremento en los productos fluorescentes lipídicos principalmente en estriado con 717.5, cerebelo con 612.8 y corteza 517.8 UFMg/proteína de fetos (Tabla 7 y Figura 11). Shukla, 1987 y Skoczynska 1990 reportaron que el Pb y el Cd aumentan la peroxidación de lípidos a través de la inhibición de la superóxido dismutasa en todas las regiones del cerebro. De nuestros resultados podemos concluir que el Pb causa cambios en el estrés oxidativo en todas las regiones del cerebro estudiadas, pero son más dramáticos cuando son cerebros inmaduros. El daño oxidativo asociado con la presencia de Pb en el cerebro ha sido propuesto para indicar un posible papel de radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la patogénesis producida por la toxicidad del Pb (Adonalylo, 1999).

El contenido de Pb en sangre encontrado puede estar relacionado con el estrés oxidativo en asociación con las alteraciones del encéfalo. Estudios en animales experimentales han reportado que el Pb modifica el metabolismo oxidativo aumentando la peroxidación de lípidos (Antonio et al, 1999). Ding et al, 2000, reportó que la exposición del Pb promueve la generación del radical hidroxilo e induce estrés oxidativo en células endoteliales con Pb y Cd . Estos resultados indican que el Pb causa dramático daño en el estrés oxidativo en todas las regiones del cerebro estudiadas, particularmente en hipocampo, tálamo y estriado (Tabla 8 y Fig. 12). Sin embargo este aumento no solo revela la acumulación de Pb, sino también el potencial oxidativo es diferente en todas las regiones estudiadas del cerebro. Se sabe que hay una reacción del anión del superóxido con el Fe^{2+} que puede generar radicales hidroxilos e incrementan las propiedades

hidrofílicas de los lípidos de las membranas principalmente de las internas de las mitocondrias favoreciendo la autoxidación de las ubisemiquinonas, esto ayuda a incrementar la liberación de electrones, sin embargo estos mecanismos que envuelven a la peroxidación de lípidos, no explican la disminución del complejo II de la cadena respiratoria (Morais y col. 1999).

Estudios previos hechos en placenta de modelos animales muestran congestión vascular, un incremento de espacios intracelulares y depósitos de material hialino de predominancia perivascular (Fuentes, 1996, Peter et al, 1991). Nosotros encontramos congestión vascular severa e intenso edema en placenta de ambos grupos, en cordón umbilical solo observamos edema intersticial (Fig. 13). Por lo que podríamos decir que si hay una correlación con respecto a los niveles de Pb y los productos fluorescente encontrados en placenta y cordón umbilical.

Graff en 1989 describe que en casos humanos que murieron por intoxicación por Pb, el cerebro y cerebelo, se observan pálidos, hinchados y con hemorragias leptomeningeales focales. En este estudio con las dosis utilizadas no se encontraron alteraciones macroscópicas en los encéfalos estudiados en ninguno de los grupos (fetos ni en adultos).

Estudios previos por microscopía óptica reportan evidencias de alteraciones inducidas por acetato de Pb, en el desarrollo y la organización de neuronas en todo el cerebro (Harry y col. 1996). Las alteraciones morfológicas en corteza

cerebral reportadas por Well et al, 1976, fueron similares a las encontradas en nuestro estudio. Nosotros observamos pocas hemorragias en las regiones del cerebro de fetos estudiados, sin embargo encontramos prominente edema en todas las áreas tanto de los fetos como de las ratas de 45 días de edad (Figs. 13-17), y esto podría ser producida porque el Pb al dañar a los capilares causa cambios en la permeabilidad y en los vasos, causando pérdida del control iónico tanto de las membranas celulares como de los diferentes organelos y provocando así la degeneración neuronal. (Hirano, 1987; Antonio, y col. 1999). En cuanto a las lesiones encontradas en los encéfalos de fetos y de ratas son esencialmente similares a los que reporta Hirano y col, 1989, pero progresivos en los encéfalos de los grupos tratados con 320 ppm.

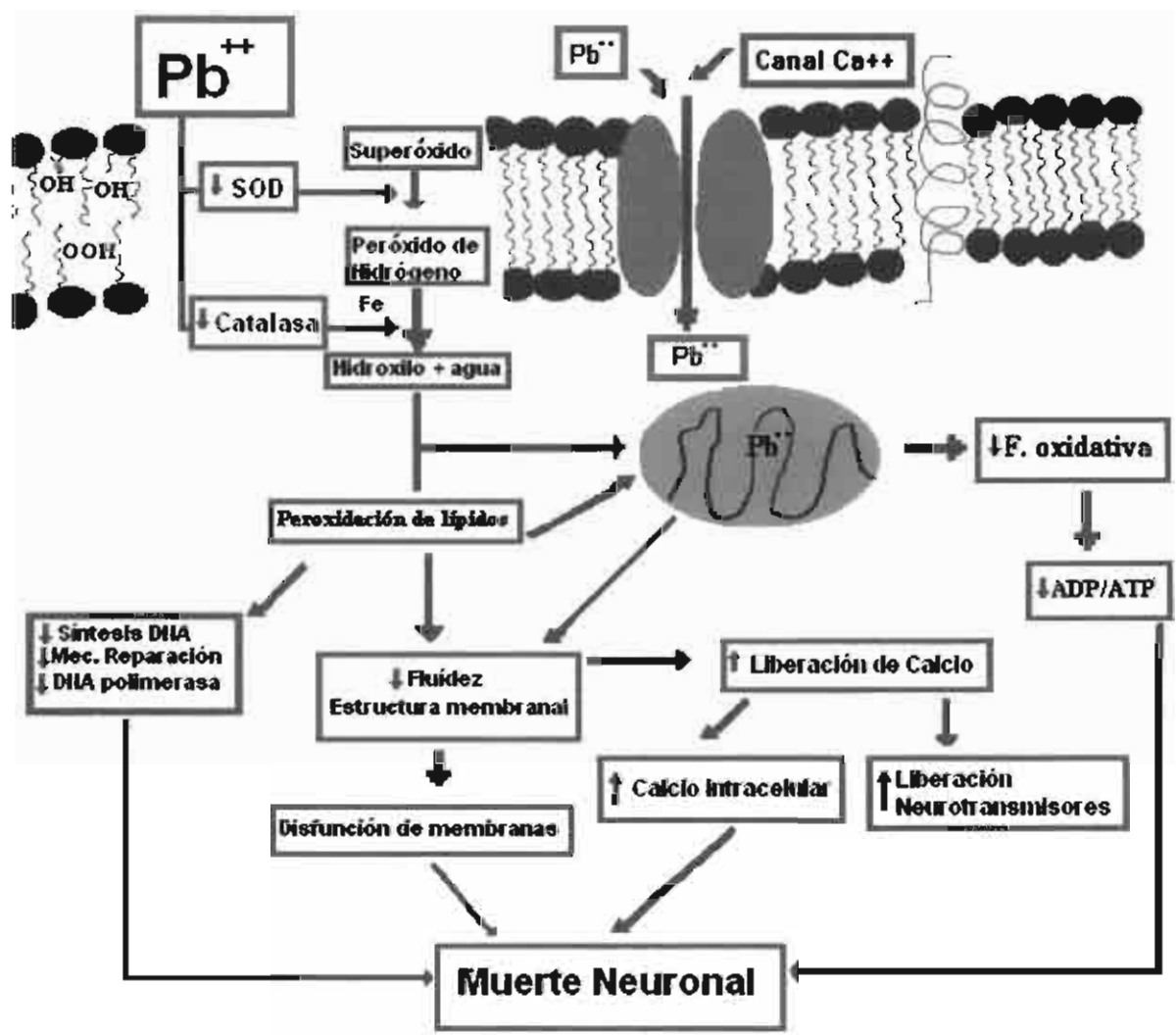
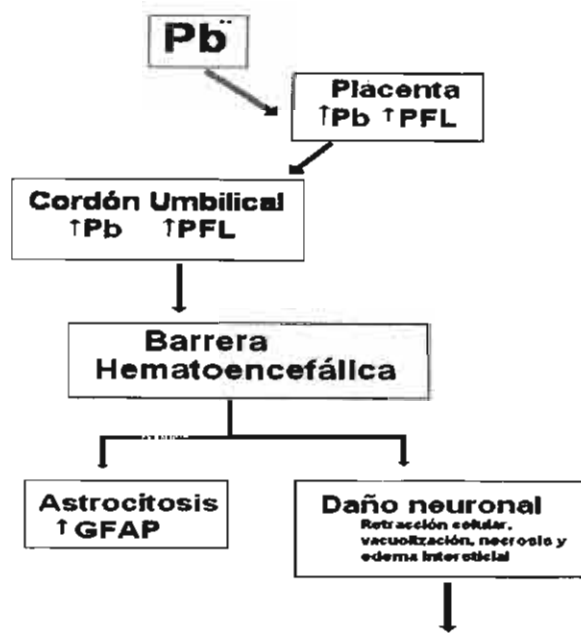
En estudios previos ultraestructurales se ha reportado que hay un incremento de agua en el citoplasma, con dilatación en las cisternas del retículo endoplásmico rugoso y las mitocondrias se observan hinchadas. (Hirano, 1987). En este estudio encontramos cuerpos densos en núcleos, tanto de algunas neuronas piramidales como de algunas neuronas redondas, estas vesículas densas probablemente estén compuestos por proteínas acídicas que contienen grandes cantidades de ácido aspártico y glutámico y poca cistina (Cassaret, 1991). El edema intracelular leve en la mayoría de las neuronas con ambas dosis y en los dos grupos. En cuanto a las células endoteliales no encontramos cambios, sólo pudimos observar edema en el neuropilo. Esto indica que las células endoteliales son capaces de adaptarse y recobrar su función normal cuando son utilizadas bajas dosis de acetato de plomo (Figs.17).

Sabemos que el Pb es un tóxico para el SNC en desarrollo y las alteraciones no solo están limitadas en la población neuronal sino también en la población astrocítica (Bucheim, 1994). Durante los primeros días después del nacimiento se han encontrado bajos los niveles de GFAP y se van incrementando durante el periodo de mielinización y la maduración astrocítica (Harry y col. 1996). Las áreas de los fetos estudiados del grupo control se observó mínima reactividad por lo que estamos corroborando los estudios hechos por Harry. Sin embargo cuando se les administró el tratamiento de 160 ppm se observó mayor reactividad de GFAP en todas las áreas estudiadas, pero se incremento en el grupo que recibió 320 ppm (Figs. 18 Y 19), esto puede ser que, la presencia del Pb en el sistema nervioso en desarrollo sirva para provocar una aceleración en la maduración de los astrocitos y proporcionar mecanismos protectores a la magnitud de la respuesta de los astrocitos a un daño físico e inducir desarrollo astrogial precoz (Harry, y col. 1996).

En el sistema nervioso maduro los niveles de GFAP en astrocitos varía con la región, se encuentran en mayor cantidad en la materia blanca que en la materia gris, sin embargo en respuesta una variedad de traumas neurales los astrocitos en la materia gris incrementan los niveles de GFAP (Harry y col. 1996). La inmunoreactividad en todas las regiones del encéfalo estudiadas fue incrementada en los grupos expuestos a una concentración de 160 ppm en comparación con los grupos control y en los grupos que recibieron 320 ppm (Fig. 18 Y 19) se observa una marcada inmunoreactividad en corteza, hipocampo y cerebelo. Estos

resultados podrían reflejar la demanda de astrocitos para secuestrar el Pb del microambiente neural (Harry y col. 1996). La prolongada exposición del Pb en las ratas de 45 días provocaron cambios prominentes en la integridad de la GFAP de corteza, hipocampo y cerebelo sin embargo se sabe que la GFAP no esta exclusivamente localizada en astrocitos, también se ha encontrado en pequeñas cantidades en oligodendrocitos y microglia (Sawia y Harry, 1996) y por lo tanto también hay una respuesta en la población glial, alterando la integridad de los oligodendrocitos y los procesos de mielinización (Sawia y Harry, 1996) Estos resultados indican que los grandes cambios morfológicos producidos por el Pb en ratas en desarrollo podrían ser parcialmente debido al incremento de la GFAP en los astrocitos, por las estrechas interacciones entre las neuronas y las células gliales.

La evaluación morfométrica del tamaño neuronal, indican un incremento absoluto en las células dañadas en todas las regiones estudiadas de ambos grupos tratados con Pb (Fig. 22 y 25) así mismo se observó una disminución en el tamaño de las células y núcleos (Fig. 26 y 27), sin embargo encontramos intenso edema intersticial, esto nos indica que hay mayor edema intersticial que intracelular (Fig. 29 y 30), estos resultados son similares a los encontrado por Alfano, 1983. La cuantificación del número de astrocitos, indican un incremento principalmente en hipocampo y cerebelo (Fig. 28), esto significa que el Pb altera la interacción neurona-astrocito que puede ocurrir cuando los astrocitos responden al daño cerebral.



Pb, esto se debe a que se produce un desequilibrio osmótico en la membrana plasmática y mitocondrial, ya que son particularmente susceptibles al daño oxidativo. El Pb inhibe la actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa produciendo un incremento de peróxido de hidrógeno y agua, así mismo inhibe la actividad de la catalasa y esto causa un aumento de radicales hidroxilo y agua, los radicales libres afectan a los lípidos de las membranas iniciando su lipoperoxidación, la rotura de las cadenas proteicas, produciendo una pérdida irreversible de la célula, Por otro lado también causa peroxidación de lípidos en la membrana mitocondrial inhibiendo la fosforilación oxidativa y esto causa una disminución del ATP, al afectar las membranas de los organelos como retículo endoplásmico y de las mitocondrias se produce un aumento del calcio en el citosol generando un incremento en la liberación de algunos neurotransmisores y modificando algunas funciones dependientes del calcio y afectando la fisiología de la célula.

También el Pb causa alteraciones en el DNA porque inhibe los mecanismos de reparación, importantes para los cambios estructurales del DNA, y por otro lado el Pb compite con el zinc y modifica el funcionamiento del DNA polimerasa.

. Aunque varios acontecimientos tanto bioquímicos como moleculares no son claros todos estos mecanismos constituyen el marco de los procesos que podrían estar involucrados para producir muerte celular y necrosis en las diferentes neuronas, células endoteliales y células gliales en las diferentes áreas del cerebro de las ratas y los fetos tratados con acetato de Pb.

VIII. Conclusiones.

- Los niveles de Pb encontrados, fueron elevados en placenta y bajos en cordón umbilical, sin embargo los productos fluorescentes lipídicos se vieron más acumulados en cordón umbilical que en placenta.
- Las concentraciones de Pb se encontraron altos en el tálamo, corteza, estriado y cerebelo de los fetos, esto nos indica que el plomo atraviesa la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica por lo tanto llega más cantidad de Pb al encéfalo.
- Las concentraciones de Pb encontradas en las regiones estudiadas de ratas de 45 días de edad se vieron reducidos en un promedio del 25 %, con respecto a las concentraciones encontradas en las mismas regiones de los fetos. esto nos indica que más cantidad de Pb atraviesa la barrera hematoencefálica porque esta completamente inmadura.
- Nuestros resultados muestran el efecto tóxico en diferentes regiones del cerebro de ratas expuestas perinatalmente a acetato de Pb en relación con estrés oxidativo inducido, Se vieron incrementados los productos fluorescentes lipídicos principalmente en estriado, corteza y cerebelo de fetos. Sin embargo se reduce en promedio un 55% en tálamo, hipocampo y

estriado de las ratas de 45 días de edad, lo que nos muestra que la barrera hematoencefálica limita la entrada del Pb al encéfalo.

Las lesiones en placenta y cordón umbilical son similares en ambos grupos,

Las lesiones morfológicas en las regiones del encéfalo estudiadas de los fetos que recibieron 160 ppm son más leves que los observados en los grupos que se les administró 320 ppm, predominando el edema intersticial en ambos grupos, y siendo el hipocampo y el cerebelo las áreas más afectadas, En cuanto a las alteraciones encontradas en las áreas estudiadas del encéfalo de las ratas de 45 días de edad, son menores en los grupos tratados con 160 ppm, que las observadas en los grupos tratadas con 320 ppm y las áreas alteradas son: la corteza, hipocampo y cerebelo, de este son las células de Purkinje, debido a la sensibilidad y función de estas células. En el análisis morfométrico se observó una disminución en el tamaño celular de un 32.61% y 25.65% en hipocampo y cerebelo, así mismo el tamaño de los núcleos presentaron una disminución del 18.2% y 32.7% en el grupo tratado con 320 ppm de acetato de plomo. Estos resultados nos indican que no hay edema neuronal. Sin embargo predominó el edema intersticial en Cx, E, y Ce de los fetos y en las ratas adultas se observó un aumento en Hp y Ce del grupo que fue tratado con 320 ppm. Este estudio nos muestran que con pequeñas cantidades de Pb se presenta edema intersticial severo en el encéfalo de ratas en desarrollo tratadas con Pb.

Se observó inmunoreactividad de la GFAP en todas las áreas del encéfalo de los fetos tratados con 160 ppm, y un incremento visible en las áreas de los fetos que recibieron 320 ppm. Con respecto a las ratas de 45 días de edad fue observado un incremento en el número astrocitos en un 162% y 331% en hipocampo y cerebelo del grupo tratado con 320 ppm. por lo que podemos concluir que el Pb induce una respuesta astrocítica en las áreas estudiadas de los fetos y las ratas tratadas con bajas dosis de Pb.

Con estos resultados podemos concluir que el modelo sirve como un marcador de daño. Pero es necesario hacer más estudios como:

- Medir los niveles de plomo en la sangre de los fetos, así como la sangre de las madres para ampliar nuestros resultados y hacer una correlación con el cordón umbilical y la placenta.
- Sabemos que hay peroxidación de lípidos, sería interesante medir algunos de los productos del estrés oxidativo como ROS, o los mecanismos de defensa como la SOD, la Catalasa, el glutatión peroxidasa y así comprender el comportamiento de las neuronas con estas dosis utilizadas.

IX Referencias

- Aladilla C.L., De León J., Pena NO. (1993) Determinación de plomo en jugos y néctares de frutas y vegetales enlatados. IV Congreso Nacional de Investigación en Salud Pública, 25-27, Cuernavaca México.
- Albert L.A., Badillo F. (1991) Environmental lead in México. *Rev. Environ. Cont. Toxicol.*, 117-49.
- Albuerne A. (1990) Taller sobre normatividad de plomo. Tepotzotlán, México, 19-30.
- Adonaylo V.N., Oteiza P.I., (1999). Lead intoxication: antioxidants defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology* 135:77-85.
- Alkondon M., Costa A.C.S., Radhan krisham V., Arostan. R., Albuquerque E.X. (1990) Selective blockade of NM;DA-activated channel currents may be implicated in learning deficits caused by lead. *FEBS* 261:124-130.
- Antonio M., T., Copras, I., Leret M.L. (1999) Neurochemical changes in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicol. Letters* 104:1-9.
- Antonio M.T., Martínez S., Leret M.L., Corpras Y. (1996). Neurotoxic effects of gestation administration of low-dose lead acetate. *J. Appl. Toxicol.* 16:431-436.
- Avediz A. (1984) Normas de la calidad aire en México. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología, México.
- Baer R., Ackerman. A. (1988) Toxic mexican folk remedies for the treatment of empacho: The case of azarcon, greta and albal de. *J. Enthopharmacol.* 24:29-31.
- Baghurst P.A., Robertson E.F., Oldfield R.K., King B.M., McMichael A.J., Vimpani G.V., and Wigg N.R. (1991) Lead in the placenta, membranes and umbilical cord in relation to pregnancy outcome in a lead-smelter community. *Environ. Health. Perspect.* 90:315-320.
- Baker E. L., Goyer R.A., Fowler B.A., Khattr. U., Bernard O.B., Adler S., Withe R., and Feldman R.G. (1980) Occupational lead exposure, nephropathy and renal cancer. *Am. J. Med.* 1:139-148.
- Baraldi M., Zanolì P., Rossi T., Borella B., Caselgrandi E., Betraglia F. (1985) Neurobehavioral and neurochemical abnormalities of pre-and postnatally lead exposed rats: zinc, cooper, and calcium status. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 7:499-509.

- Barroso-Moguel and I. Costero. (1962) Argentaffin cells of the carotid body tumor. *AM. J. Pathol.* 41:389-403.
- Barton J., Conrad. S., and Harrison L. (1978) Effects of iron on the absorption and retention of lead. *J. Lab. Clin. Med.* 92:537-547.
- Bellinger D., Leviton A., Wateraux C., Needleman H., Rabinowitz M. (1987) Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *N. Engl. J. Med.* 316:1037-1043.
- Bellinger D.C., Stiles K.M., and Needleman H.L. (1992) Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: a long-term follow-up study. *Pediatrics.* 90:855-861.
- Birnboim H.C. (1988) Superoxide anion may trigger DNA strand breaks in human granulocytes by acting at a membrane target. *Ann. NY. Acad. Sci.* 551:82-94.
- Boniton Kopp C., Huel G., Moreau T. and Wendling R. (1986) Prenatal exposure to lead and cadmium and psychomotor development of the child at 6 years. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8:307-310.
- Breadbury M.W.M., and Deane R. (1993) Permeability of the blood-brain-barrier to lead. *Neurotoxicol.* 14:131-136.
- Bressler J. and Goldstein W. G. (1991) Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 41: 479-484.
- Bressler J., Kyung-ah, Kim, Tamal Ch. and Goldstein G. (1999) Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochem. Res.* 24:595-600.
- Brunning J.L., Kintz B.L. (1977) *Computational handbook of statistics*, 2a ed. Ed. Scott, Foresman & Co. Glenview Ill.
- Buchheim K., Noack S., Stoltenburg G., Litzenthal H., and Winneke G. (1994) Developmental delay of astrocytes in hippocampus of the rhesus monkey reflects the effect of pre- and postnatal chronic low level lead exposure. *Neurotoxicol.* 15:665-669.
- Casarett and Doull's. (1991) *Toxicology the basic science of poisons*. 4th Ed. ed. Mc Graw-Hill, INC. pp 639-641.
- Chang L.W., and Wade P.R. (1980) Prenatal and neonatal toxicology and pathology of heavy metals. *Advan. Pharmacol. Chemot.* 17:195-231.

- Chi-Hsu C., Liu M M.Y., Chin-HsuC., Chen C.L.Y., Guo Y. L. (1998) Effects of vitamine E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. *Toxicol.* 128:169-179
- Chilson J.J. (1984) The continuing hazard of lead exposure and its effects in children. *Neurotoxicol.* 5:23-42.
- Choi D.W. (1992) Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23:1261-1276
- Christie N., and Acosta M. (1983) In vitro assesment of the toxicity of metalcompounds III. Effects of metals on DNA structure and function in intact cells, *Biol. Trace Elements Res.* 5:55-71.
- Claudio L., Lee T., Wolff M.S., Wetmur J.G. (1997) A murine model of genetic Supceptibility to lead bioaccumulation. *Fund. Apl. Toxicol.* 35:84-90.
- Cohen M.M. (1989) Biochemical aspects of lead neurotoxicity. In: Vinken P.J., and Beuyn G.W., *Intoxication of the nervous system. Parte I.*, ed. North-Holland Publishing Company, Amsterdam-New York., Oxford. 65-72.
- Conrad M and Barton. J. (1978) Factors affecting the absortion and excretion of lead in the rat. *Gastroenterology* 74:731-740.
- Contreras R. (1990) Gasolinas de alto octanaje; con bajo contenido de plomo y azufre. *Rev. Mexicana de Higiene y Seguridad* 14-17.
- Cooper D.B. (1980) Plomo epidemias en la Ciudad de México 1761-1813. Colección Salud y Seguridad Social. Serie Historia de México, D.F. Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Cory-Slechta D.A. (1995) Relationships. between lead-induced learning impairments and changes in dopaminergic cholinergic and glutamatergic neurotransmitter systems functions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35:391-415.
- Coyle J. y Puttfarken P. (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenetative disorders. *Science.* 262: 689-694.
- Craswell P. W., and Svensgaard D.J. (1987) Chronic lead nephropaty. *Annu. Rev. Med.* 38:169-163.
- Daggett D.A., Oberley T.D., Nelson S.A., Wright L.S, Kornguth S.E., Siegel F.L., (1998) Effects of lead on rat kidney and liver GST expression and oxidative stress. *Toxicol.* 128;191-206

- Davis K. (1990) The molecular biology of aging. Liss, R.A., ed. . New York. pp.123.
- Deknudt G., Leonard A., and Ivanov B. (1973) Chromosome aberrations observed in make workers occupationally exposed to lead. Environ. Physiol. Biochem. 3:132.136.
- Del Maestro R., (1991). Free radicals as mediator of tissue injury In: Dreosti, I. (Editor) Trace elements, micronutrients, and fre radicals. The humana Press Inc. New Jersey pp. 28-30.
- Diario Oficial Mexicano. (1993) Tomo CDXXXII, no. 9, NOM-002-SSAI. México, D.F., Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos.
- Dong K.L., and Ing Kang Ho., (1998). Responses to N-Methyl-D-Aspartato and kainic acid in cerebellar granule cells of lead-exposed rat pups. Neurotoxicol. 19:49-56.
- Douglas C. A., Doyle G. G. In: Casarett and Doull's. (1991) Toxicology the basic science of poisons. 4ª Ed. ed. Mc Graw-Hill, INC. pp 407-412.
- Duke R.C., Ojcius. D. M., Ding-E Young. C. (1996) Cell Suicide in health and disease. Scientific American. December de 1996:48-55.
- Dyatlov V.A., Platoshin A.V., Lawrence D.A., Carpenter D.O. (1998) Lead potentiates cytokine- and glutamate-mediated increases in permeability of the blood-brain barrier. Neurotoxicol. 19:283-292.
- Ercal N., Neal R., Treerapthan., Lutz M.P., Hammond T.C., Dennerly P.A., Spitz D.R. (2000) A role for oxidative stress in supressing serum immunnoglobulin levels in lead-exposed fischer 344 rats. Arch. Environ. Toxicol. 39:251-256.
- Estrada F.E., Peralta ZI., Rivas M.P. (1982) Manual de Técnicas Histológicas. Ed. AGT Editor S.A., 140 p.
- Farias P., Borja-Aburto V H., Ríos C., Hertz-Picciottol., Rojas-López M. and Chavez-Ayala R. (1996) Blood lead levels in pregnant women of high and low socioeconomic stasus in México City. Envir.Health.Persp.104:1070-1074.
- Flora G.J, Seth P.k., (2000). Alterations in some membrane properties in rat brain following exposure to lead. Cytobios. 103:103-109.

- Folch A., Espinosa Z.R., Orizaga S.J., (1985) Bases bioquímicas y patológicas, aplicaciones clínicas, 2ª. Ed. Ed. Interamericana. Cap. 12 y 20.
- Franklin C.A., Inskip M.J., Bacchanale C.L., Edwards C.M., Manton W.I., Edwards E and Flaherty E. J. O. (1997) Use of sequentially administered stable lead isotopes to investigate changes in blood lead during pregnancy in a nonhuman primate (*macaca fascicularis*). *Fundamen.Appl. Toxicol.* 39:109-119.
- Fuentes A. L., Soto-Mora C. (1993) Influence of lead on pregnant women in metropolitan México City. *Cont. Toxicol.* 53:553-559.
- Galvao .A.C, y Corey, G. (1989) Serie vigilancia 8 Plomo. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Mundial de la Salud. Metepec pp. 1-103.
- García-Arenas G., Claudio L., Severiano P and Ríos C. (1999) Lead acetate exposure inhibits nitric oxide synthase activity in capillary and synaptosomal fractions of mouse brain. *Toxicol. Sci.* 50:244-248.
- Gerber G., Leonard A., and Jaquet P. (1980) Toxicity, mutagenicity and teratogenicity of lead. *Mutat. Res.* 76:115-141.
- Goldstein G.W. (1992) Development neurobiology lead toxicity. In: *Human Lead exposure*, Ed. CRC Press. INC. pp. 126-34.
- Goyer R.A. (1985) Toxic effects of metals in: *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 3rd. ed. Macmillan Publishing Co. New York, pp. 582-635.
- Goyer R.A. (1993) Toxic effects of metal. In: *Toxicology: The basic science of poisons*. Eds. M O Admur, J. Doull and C D Laassen. Ed. Mc. Gaw Hill 4Th ed. New York. pp 623-680.
- Graff W.J. (1989) Clinical aspects of lead poisoning In: *Vinken P.J., and Beuyn, G.W., Intoxication of the nervous system. Parte I., ed. North-Holland Publishing Company, Amsterdam-New York., Oxford.* 1-34.
- Grisham M., (1992). Introduction In: *Reactive metabolite of oxygen and nitrogen in biology and medicine*. R.G., Landes Company, Georgetown Tx pp 1-55.
- Guilarte T.R, McGlothlan J.C., Nihei M.K., (2000), Hippocampal expression of N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDAR1) subunit splice variant mRNA is altered by developmental exposure to Pb(2+). *Brain Res Mol. Brain Res.*76:299-305.

- Gürer H., Özgünes H., Neal R., Douglas R. S. Erçal. (1998) Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succiner in red blood cells from lead-exposed rats. *Toxicol.* 128:181-189.
- Gutteridge J.M.C. and Halliell B. (1990) The measurement and mechanisms of lipid peroxidation in biological system. *TIBS*:15:129-134.
- Hageman J., Bast A y Vermeulen, N.P. (1992) Monotring of oxidative free radical damage in vivo analytical aspects. *Chem. Biol. Interactions.* 87.243-293.
- Halliwell B. and Gatteridge J. (1989) *Free radicals in biology and medicine*, Clearedon Press, Oxford.
- Hammond B.P. (1982) Metabolism of lead. En: Chisolm J.J., O'Hara D.M., ed. *Lead absortion in children. Management, clinical and enviromental aspects.* Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 11-19.
- Harry G.J., Schmitt T.J., Gong Z., Brown H., Zawia N., Evans H.L. (1996) Lead induced alterations glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the developing rat brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139:84-93.
- Hartwing A. (1994) Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: A Review. *Environ. Health Perspect.*102:45-50.
- Hartwing A. (1995) Current aspects in metal genotoxicity.*Biol. Metals.*8:3-11.
- Hasan F., Cookman G.R. Keane G.J., Bannigan J., King W.B., and Regan C.M. (1989) The effect of low level lead exposure on the postnatal structuring of the rat cerebellum. *Neurotoxicol. Teratol.* 11:-440.
- Hayatt M.A. (1981) *Fixation for electron microscopic.* USA. Academic Press INC 530 p.
- Heffes C.S., and Mullick F.G. (1995) *Metódos histotecnológicos.* Editores Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B., Sobin L.H., Instituto de Patología AFIP. y ARP. USA. 280 pp.
- Hernández M., Romiew I., Ríos C., Rivero A. and Palazuelos. (1991) Lead glazed ceramics as major detrmnants of blood lead levels in mexicans women. *Environ. Health. Persp.* 94:117-120.
- Hisao T., and Makoto K. (1981) Free erythrocytes protoporphyrin (FEP) in a general population workes exposed to low-level lead and organic solvent. *Worker Environ. Res.* 25:310-316.

- Hirodina P.D., Peters D.A.V. and Singhal R.L. (1976) Effects of chronic exposure to calcium, lead and mercury on brain biogenic amines in the rat. Res. Comun. Chem. Path. Pharmacol 15:483-493.
- Hirano A., Iwata, M., (1989) Neuropathology of lead intoxication. In: Vinken P.J., and Beuyn, G.W., Intoxication of the nervous system. Parte I., ed. North-Holland Publishing Company, Amsterdam-New York., Oxford. 35-63.
- Infante G. S., Zárate de Lara G., P. (1997) Métodos estadísticos 4ª ed. Ed. Trillas, 643 p.
- Instituto Nacional de Ecología. (1997) Programa de gestión ambiental de sustancias tóxicas de atención prioritaria. SEMARNAP. 126.
- Janin Y., Couinaud C., Stone A., And Wise L. (1985) The lead induced colic. Syndrome in lead intoxication. Sug. Annu. 17:287-307.
- Jesberger J.A. (1991) Oxigen free radicals and brain dysfunction. Int. J. Neurosci. 57:1-17.
- Joint Program. (1984) FAO/OMS. CODEX alimentary norms for Fruit juice, of concentrated fruits nectar of fruits. CODEX Alimentaras, Vol. X, 1st ed. Rome: Food and Agricultural Organization, World Healt Organization.
- Joseph P. Bressler and Gary W. Goldstein. (1991) Mechanisms of lead neurotoxicity. Biochemical Pharmacology 41:479-484.
- Keogh J. (1992) Lead in: Graven L. (editor) Hazardous materials toxicology clinical principles of environmental health. Williams & Wilkins, Baltimore Maryland pp. 834-839.
- Klaassen C. D. (1996) Metales pesados y sus antagonistas. En: Las bases farmacológicas de la terapeutica. 9ª. edición. Editada por JG Hardman, LE Limbird Pb Molinoff, RW Ruddon y AG Goodman- Gillman. McGraw-Hill Interamericana. pp 1755-1761.
- Kehrer J., (1993). Free radicals as mediator of tissue injury and disease. Crit. Rev. Toxicol. 23:21-48.
- Kerper L.E., Hinkle P.M., (1997). Lead uptake in brain capillary endothelial cells: activation by calcium store depletion. Toxicol. Appl. Pharmacol. 146:127-133.
- Kowaltowski A.J., and Vercesi A.E. (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. Free Rad. Biol. &Med.26:463-471.

- Lasley S. and Gilbert. M.E. (2000) Glutamatergic components underlying lead-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity. *Neurotoxicol.* 21:1057-1068.
- Lebel P., and Bondy C.S. (1991) Oxygen radicals: Common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 13:341-346.
- Loscher W., Boheme G., Muller F., and Pagliusi S. (1985) Improved method for isolating synaptosomal from 11 regions of one rat brain: electron microscopic and biochemical characterization and use in the study -aminobutiric acid. *in vivo. J. Neurochem.* 45:879-889.
- Lowry O.H., Rosebroug, N.J., Farr, A.L. (1951) Protein measurement the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Mackena O., Arnold G., and Holtzaman E. (1976) Microperoxisoma distribution in the central nervous system of the rat. *Brain Res.* 117:181-194.
- Martin R. K., Musk P. and Bouldin T. W. (1977) An appraisal of rodent models of lead encephalopathy. *Neurotoxicol.* Edited by Roizin H. Shikari and N. Grecevic. Reven Press, New York. pp 299-302.
- Miller D.T., Paschal D.C., Gunter E.W., Stroud P.E., and D'Angelo J. (1987). Determination of lead in blood using electrothermal atomisation absorption spectrometry, a L'voy platform and matrix modifier. *Analyst* 112:1701-1704.
- Ming Z., and Morgan E. (1990) Effect of lead on the transport of transferrin-free and transferrin-bound iron into rabbit reticulocytes. *Biochem. Pharmacol.* 40:1049-1054.
- Mitchell Cohen, Drothy Latta, Timothy Coogan and Max Costa. (1990) Mechanisms of metal carcinogenesis the reactions of metals with nucleic acids. In: *Biological Effects of heavy metals vol. II.* E.C. Foulkes Ed. Pree. U.S.A. pp. 44-48.
- Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A., (1989). Biosynthesis of nitric oxide from arginine: A Pthway for regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38:1709-1715.
- Morais C, S., Pereira C., Resende O. C. (1999) Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Rad. Biol. & Med.* 26:3-13.
- Mursulja B.B., Mursulja B.J., Fujimoto T., Klatzo Y., and Saptz, M. (1976) Isolation of brain capillaries: a simplified technique. *Brain Res.* 110:361-365.

- Nakao N. (1996) Protection of striatal and nigra neurons by trophic and antioxidant mechanism: A study on in vitro and in vivo brain insult models and neuronal transplants. Wallin and Dholm, Lund.
- Needleman H., Gune C., Leviton A., Reed R., Peresie, H. Maher C., and Barrett P. (1979) Defects in psychology and classroom performance in children with elevated dentine lead levels. *N. Engl. J. Med.* 300:689-695.
- Nicotera P., Kass G., Duddy S., and Orrenius S., (1991). Calcium and signal transduction in oxidative cell damage In: Duncan C, (Editor), Calcium, oxygen, radicals and cellular damage, Cambridge University Press, New York. pp. 17-33.
- Parry C, Eaton J., Kohl A. (1991) Lead-hazardous eye makeup from the third world to the first world. *Environ Health Perspect*, 94:121-123.
- Partl S., Herbst H., Schaeper F., Mohnhaupt A., Stoltenburg-Didinger G., (1998) GFAP gene expression is altered in young following developmental low level lead exposure. *Neurotoxicol.* 19:547-551.
- Petróleos Mexicanos. (1990) Disminución del plomo en las gasolinas. Subdirección Técnica Administrativa. Coordinación Ejecutiva de Protección Ambiental y Desarrollo Regional. Gerencia de Protección Ambiental. Taller sobre normatividad de plomo, Tepetzotlán, México, 29-30.
- Ping-Chi Hsu and Yueliang Leon Guo (2002) Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 180:33-44.
- Portera-Cailliau.C., Price D.L., and Martin L.J. (1997) Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J. Comp. Neurol.* 378:70-87.
- Programa de Gestión ambiental de Substancias Tóxicas de Atención Prioritaria. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAF. (1997).
- Rahmed C. (1973) The effect of metal compounds on chromosome segregation. *Mutat. Res.* 21:45-46.
- Rehman S.V. (1984) Lead induced regional lipid peroxidation in brain. *Toxicol. Letter.* 21:333-337.
- Raps SP., Lai JC., Hertz and Cooper AJ. (1989) Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Res.* 493:398-401.

- Ríos C., Galván-Arzate S., Tapia R. (1989) Brain regional thallium distribution in rats acutely intoxicated with Tl_2SO_4 . *Arch. Toxicol.* 63:34-37.
- Robb-Gaspers S.J., Connor R.J. (1997) Oxidative stress-induced cell damage in the CNS, In: *Metals and oxidative damage in neurological disorders*. Ed. James R. Connor. Plenum Press, New York. pp 341-349.
- Romieu I., Palazuelos E., Hernández A M., Ríos C., Muñoz I., Jiménez C. y G. Cahero. (1995) Fuentes de exposición a plomo en la ciudad de México. En: *Intoxicación por plomo en México: Prevención y Control*, Ed. M. Hernández y E. Palazuelos. Instituto Nacional de Salud Pública. pp. 57-76.
- Romieu I., Palazuelos E., Hernández A., Ríos C., Muñoz I., Jiménez C., Cahero G. (1994) Sources of lead exposure in Mexico City. *Environ. Health Perspect.* 102: 384-389.
- Royal Society of Canada. (1986) *Lead in the Canadian environment: Sciences and regulation*. Ottawa: Royal Society of Canada.
- Rossi E., Costin K. and Garcia-Webb P. (1990) Effect occupational lead exposure on lymphocyte enzymes involved in heme biosynthesis. *Cli. Chem.* 36:1980-1983.
- Rothenberg S.J., Pérez G. I.A., Perroni-Hernández, Shnas-Arrieta L. Casino-Ortiz, Suro-Cárcamo , Flores-Ortega, Karchmer S. (1990) Fuentes de plomo en embarazadas de la cuenca de México. *Salud Pública Mexico*, 32: 632-643.
- Rusell L.D. Bazzola J.J. (1992) *Electron microscopic*. Boston, Jones and Bartlett Publisher 530 p.
- Saldivar L., Tovar A., y Namihira D. (1996) Plomo En: *Introducción a la toxicología ambiental*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. pp 113.
- Schweinsberg F. and Ven Karsa, L. (1990) Heavy metal concentrations in humans. *Comp. Biochem. Physiol.* 95:117-120.
- Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE). *Boletín Informativo de la Ciudad del Aire*. Periodo 1986-1991. México, D.F. Subsecretaría de Ecología.
- Selvin-Testa A, Capani F., Loidl C.F., Pecci-Saavedra J., (1997). The nitric oxide synthase expression of rat cortical and hippocampal neurons changed after early exposure. *Neurosci. Lett.* 236:75-78.

- Silbergeld E.K., and Adler H.S. (1978) Subcellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Brain Res.* 148:451-467.
- Singh C., Saxena D.K., Murthy R.C., & Chandra S.V. (1993) Embryo-fetal development influenced by lead exposure in iron-deficient rats *Human & Exp. Toxicol.* 12:25-28.
- Shukla GS., Hussain T and Chandra, S.V. (1987) Possible role of superoxide dismutase activity and lipid peroxide levels in cadmium neurotoxicity: In vivo and In vitro studies in growing rats. *Life Sciences.* 14:2215-2225.
- Simons T. J.B. (1993) Lead-calcium interactions in cellular lead toxicity. *Neurotoxicol.* 14:77-86.
- Simonian N.A., and Coyle J.T. (1996) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annual Review INC.* pp 83-106.
- Skoczynska A., Smolik, R., Jelen, M. (1990) Lipid abnormalities in rats given small doses of lead. *Arch. Toxicol.* 97:200-204.
- Slechta-Cory D.A. (1995) Relationships between lead-induced learning impairments and changes in dopaminergic, cholinergic, and glutamatergic neurotransmitter system functions. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35:391-415.
- Snyder S.H., Bredt D.S., (1991). Nitric oxide as neuronal messenger trends. *Pharmacol.Sci.* 12:125-128.
- Steel R.G.D., and Torrie J.H. (1969) Principles and procedures on statistics, Mc. Graw-Hill, New York.
- Stohs S., (1995). Synthetic pro-oxidants: Drugs, pesticides and other pollutants. Ahmad, S. (Editor). *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology.* Chapman & Hall, New York. pp. 117-167.
- Stuzynska L., Bubko I., Walski M., Rafalowska U., (2001). Astroglial reaction during the early phase of acute lead toxicity in the adult rat brain. *Toxicol.* 28:121-131.
- Strand L., Meyer U., Flesher B., Redecker A., and Marver H. (1972) Decreased red cell uroporphyrinogen I synthetase activity in intermittent acute porphyria. *J. Clin. Invest.* 51:2530-2536.

- Sündström R., Mützing K., Kalimo H., and Sourander P. (1985) Changes in the integrity of the blood-brain barrier in suckling rats with low dose lead encephalopathy. *Act. Neuropathol.* 68:1-9.
- Task Group on metal accumulation. (1973) Accumulation of toxic metals with specific reference to their absorption, excretion, and biological half-times. *Environ. Physiol. Biochem.*, 3:65-107.
- Tomokuni K., and Ichiba M. (1990) Tolerance to lead induced porphyrin metabolic disorders following lead pretreatment in mice. *Toxicol. Lett.* 54:215-220.
- Triggs J.W. and Willmores, J.L. (1984) In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical F^{2+} injection. *J. Neurochem.* 42:976-980.
- Traystman J. R. (1991) Oxygen radicals mechanism of brain injury following ischemia and reperfusion. *TINS.* 1185-1194.
- Tsao D.A., Yu H.S., Cheng J.T., Ho C.K., Chang H.R., (2000). Alterations in beta-adrenergic receptor density and adenylate cyclase activity in the rat brain treated chronically with lead. *Toxicol.* 146:93-99.
- Van Lookeren Campagne, Lucassen P.J., Vermeulen J.P., and Balázs. R. (1995) NMDA and kainate induce internucleosomal DNA cleavage associated with both apoptotic and necrotic cell death in the neonatal rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 7:1627-1640.
- Viarengo A., and Nicotera P. (1991) Possible role of Ca^{2+} in heavy metal cytotoxicity. *Comp. Biochem. Physiol.* 100c:81-84.
- Weirner N. and Molinoff P. (1989) In: Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects. (Siegel G.S., et al. ed). Chapter 11, pp. 223-250. Raven Press Ltd. New York.
- Wells G.A.M., Howell J.M.C. and Gopinanth C. (1976) Experimental lead encephalopathy of calves. Histological observations on the nature and distribution of the lesions. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* 2:175-1980.
- WHO (1992) Revision of the WHO guidelines for drinking-water quality. Report of the final task group meeting. Ginebra: World Health Organization.
- Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251-306.

- Wyllie A.H., and Duvall. E. (1992) Cell injury and death. In: Oxford Textbook of pathology (McgeeJ, O'D., Isaacson P.G., and Wright N.A., eds), pp 141-157. Oxford University Press. Oxford, New York.
- Xu Y.Z., Ruan D.Y., Jiang Y.B., Chen S.Y., Chen J.P., (1998). Nitric oxide effects LTP in area CA1 and CA2 of hippocampus in low-level lead exposed rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 20:69-73.
- Zawia N.H., and Harry G.J. (1999) Devepmental exposure to lead interferes with glial and neuronal differential gene expression in the rat cerebellum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 138:43-47.
- Zelikoff J., Li J. Hartwing A., Wang X., Costa M., and Rossman T. (1988) Genetic toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis* .10:1727-1732.

Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate

J. Villeda-Hernández,^{1,4} R. Barroso-Moguel,¹ M. Méndez-Armenta,¹ C. Nava-Ruiz,² R. Huerta-Romero¹ and C. Ríos^{3*}

¹Laboratorio de Neuromorfología Celular, ²Departamento de Neuropatología; ³Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “M. Velasco Suárez”, México City, Mexico; and ⁴Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Sistemas Biológicos, México City, Mexico

ABSTRACT: Neurotoxicity associated with lead exposure may be the result of a series of small perturbations in brain metabolism, and, in particular, of oxidative stress. Some studies have suggested a lead-induced enhancement on lipid peroxidation as a possible mechanism for some toxic effects of lead. However, there are no reports about the association between lipid peroxidation enhancement and brain lead content. In this study, we determined the concentration of lead and the formation of lipid fluorescence products in the blood, as well as in the parietal cortex, striatum, hippocampus, thalamus, and cerebellum of rats exposed prenatally and postnatally to variable concentrations of lead acetate through drinking water. Pregnant Wistar rats were intoxicated throughout gestation with solutions containing either 320 or 160 ppm of lead. The pups were treated after birth in the same way until 45 days of age. Control animals received deionized water for the same period of time. The developing rats were sacrificed at postnatal day 45 and lead level was assessed biochemically in the blood and different brain regions. Results showed that blood lead levels were increased in a dose-dependent manner. In the brain, lead accumulated preferentially in the parietal cortex, striatum, and thalamus as compared to the control group, while lipid fluorescence products were significantly increased in the striatum, thalamus, and hippocampus of the treated animals. These data suggest that in the brain of rats exposed to lead acetate, lead produces a neurotoxic effect with a complex correlation with both lead regional content and lipid peroxidation. © 2001 Elsevier Science Inc.

KEY WORDS: Neurotoxicity, Lead intoxication, Central nervous system, Lipid peroxidation.

INTRODUCTION

The toxicity of lead is of concern to public health due to the persistence of lead in the environment. Neurotoxicity associated with lead exposure may be the result of a series of small perturbations in brain metabolism [23]. Injury to the blood—brain barrier seems to play a major role in the pathogenesis of acute lead encephalopathy but barrier damage may also be involved in the development of more subtle symptoms associated with low-level exposure [23,29].

Studies on the localization of lead in the central nervous system (CNS) have been insufficiently refined to determine if lead exposure results in specific accumulations within defined regions or

cells types in the brain. Generally, lead levels are highest in the hippocampus and cortex [16,23]. Because lead at low dose affects the blood—brain barrier function, it is difficult to sort out whether the distribution of lead within the CNS reflects the relative vascularization of different brain regions as opposed to a specific uptake and distribution process [13,14,24]. Many of the neurotoxic effects of lead appear to be related to the ability of lead to mimic, or in some cases inhibit, the action of calcium as a regulator of cell function [3,7,23].

Lead is capable of causing oxidative stress in the liver, kidney, and brain. The potential role of oxidative stress injury, which is associated with lead poisoning, suggests that antioxidants may enhance the efficacy of treatment designed to mitigate lead-induced toxicity [17]. Previous studies on experimental animals have reported that lead alters the lipid metabolism and enhances lipid peroxidation directly, or indirectly through the inhibition of superoxide dismutase in all brain regions [2,27,28]. Lead appears to exacerbate lipid peroxidation induced by H₂O₂ and iron. Because increased fluxes of superoxide and H₂O₂ are known to induce lipid peroxidation and oxidative stress [17], these actions could be relevant to understand lead neurotoxicity.

The neuropathological effects of lead on cellular elements of the CNS include cell loss, hemorrhage, and edema [15,32]. Effects of lead in biological systems are well known and have been thoroughly documented in animal and human populations, especially in children [10,13,16]. In the CNS, lead toxicity is more common in children than in adults and it may produce either overt symptoms, such as acute encephalopathy with ataxia, headache, convulsions, and coma, or less severe deficits, including learning disorders and hyperactive behavior [8,19].

In the present study the brain regional concentration of lead was determined to relate it with enhanced lipid peroxidation, an index of oxidative stress, in parietal cortex, striatum, hippocampus, thalamus, and cerebellum of rats exposed to variable doses of lead. The work was aimed at ascertaining a possible correlation between lead levels in the brain and in the blood and lipid peroxidation in the same samples.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Lead acetate, methanol, chloroform, and formaldehyde were obtained from Mallinckrodt, J.T. Baker (México). Some reagents

* Address for correspondence: Dr. Camilo Ríos, Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, Insurgentes Sur 3877, México City, C.P. 14269, México. Fax: +525-528-0095, E-mail: crios@cueyatl.uam.mx

were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were obtained from E. Merck (México). Deionized water (Milli R/Q, Millipore, Milli-Q water system, $10\mu\Omega\text{cm}$) was used for the preparation of all reagents and solutions.

Animals

Thirty pregnant Wistar rats, NIH bred in-house strain, weighing 200–250 g, were used. The rats were fed a standard chow diet (Purina chow) *ad libitum* and had free access to water. Room darkness was maintained between 1900 and 0700 h, room temperature was kept at 25°C, and relative humidity was at 40%. Rats were housed individually. Rats were mated during the night. The morning on which a sperm plug was found was designated as day 0 of gestation. Twenty female pregnant Wistar rats were then treated through the drinking water with a solution containing either 160 or 320 ppm (10 rats per group) of lead acetate during the 21 days of gestation. The pups were treated after birth in the same way until 45 days of age. Rats of the control group were treated with deionized water during the same period of time. After treatment, the developing rats (10 animals per treatment and per assay) were anaesthetized with chloroform; the blood was collected for lead analysis by cardiac puncture into EDTA lead-free tubes. Brains were rapidly removed, washed, and kept on ice for rapid dissection of brain regions. All materials used during the isolation procedure and all vials used for sample storage were rendered lead-free by immersion in 3% HNO_3 for several days followed by extensive rinsing with deionized H_2O .

Lead Analysis in the Blood and in Brain Regions

Lead in the blood, as well as in the parietal cortex, striatum, hippocampus, thalamus, and cerebellum lead were analyzed by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (GFAAS), according to previously reported methods [18,25,26]. All laboratory glassware, polypropylene tubes, and disposable micropipette tips were immersed for several hours in 1:1 v/v concentrated $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$, thoroughly rinsed in deionized water, and nitrogen gas dried before use, to avoid any possible contamination. Blood samples (200 μl) were added to 800 μl of Suprapur HNO_3 , centrifuged at 15000 rpm for 15 min, and a 100- μl aliquot was taken from the clear solution and diluted (1:5 v/v) with deionized water.

Brain regions were dissected out according to the technique described by Glowinski and Iversen [12]. Tissue samples were carefully weighed, placed in the polypropylene tubes, and digested in 1 ml of concentrated HNO_3 Suprapur (E. Merck) in a shaking water bath at 60°C for 30 min. This treatment ensures complete destruction of organic matter [5]. After digestion, a 100 μl aliquot was taken from the clear solution and diluted (1:5 v/v) with deionized water. Calibration curves were constructed by adding known amounts of lead standard (E. Merck). Analysis of diluted samples of blood and the brain regions were injected into the atomic absorption spectrophotometer (Perkin-Elmer Model 3110) with furnace (HGA-600) and autosampler (AS-60) adjusted to a wavelength of 283.3 nm (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Blood lead (Pb) results were expressed as μg of Pb/dl blood and content of Pb in brain regions was expressed as μg of lead/g tissue weight.

Assay of Lipid Fluorescent Products

The formation of lipid-soluble fluorescence (an index of lipid peroxidation) was monitored using the technique described by Triggs and Willmore [31] modified by Santamaría and Ríos [30]

for *in vivo* analysis of lipid fluorescent products (LFP). The developing animals were sacrificed by decapitation. The blood was centrifuged at 3000 rpm for 10 min; for the assay of LFP [22] the supernatant was separated, and 0.5 ml mixed with 4.0 ml of chloroform-methanol (2:1 mixture). The tubes were capped, gently mixed, and placed on ice for 30 min to permit phase separation. From extracted chloroformic layer 2.5 ml were taken, 1 ml of deionized water was added and vortexed to stand on ice for additional 15 min. The aqueous phase was then discarded and 0.9 ml of the chloroform layer were transferred into a quartz cuvette, and 0.1 ml of methanol added.

Samples of parietal cortex, striatum, hippocampus, thalamus, and cerebellum were homogenized (1:20 g/ml) for 15 s, after addition of 3 ml of saline solution (0.9%) and each tube was vortexed for 1 min. Aliquots of the homogenates (1 ml each) were mixed with 4.0 ml of chloroform-methanol (2:1 v/v), placed on ice for 30 min to permit phase separation. Aqueous phase was discarded, 0.9 ml of the chloroform layer pipetted into quartz cuvette and 0.1 ml of methanol was added. In all cases, fluorescence was measured in the chloroformic layer using a Perkin-Elmer LS50B luminescence spectrophotometer at 370 nm of excitation and 430 nm of emission wavelengths. Sensitivity of the spectrophotometer was adjusted with a quinone sulfate standard containing 0.1 μg quinone in ml 0.05 M H_2SO_4 rendered to 150 fluorescence units, prior to the measurement of the samples. Final results were expressed as fluorescence units/ml (blood) or fluorescence units per mg of protein (brain regional tissue).

Protein Measurement

The protein concentration assayed in 1 ml aliquot of the homogenate used for LFP was estimated by the method of Lowry et al. [21] using bovine serum albumin as a standard. Results of lipid peroxidation were corrected by protein content in each sample.

Statistical Analysis

Data were statistically assessed using analysis of variance to determine differences between control and experimental groups, followed by the Tukey *post-hoc* test for multiple comparisons [4]. The value of $p < 0.01$ was chosen as level of significance.

RESULTS

Tissue and Blood Lead Concentrations

Blood lead levels after 160 ppm treatment increased by 7.8-fold, while at 320 ppm the increase was 10.4-fold when compared to control values (Fig. 1). The content of lead in the parietal cortex, striatum, thalamus, hippocampus, and cerebellum after 160 ppm treatment was increased by 7.8-fold, 11.1-fold, 8.8-fold, 6.5-fold, and 7.3-fold, respectively. At 320 ppm the content of lead in the same regions increased by 12.0-fold, 13.3-fold, 11.5-fold, 10.1-fold, and 9.7-fold in the lead-treated rats compared with the respective control groups (Fig. 2).

Effects of Lead on Lipid Peroxidation

LFP in blood after 160 ppm treatment was increased by 1.4-fold, while at 320 ppm, enhancement was 1.9-fold (Fig. 3). Lipid fluorescence products in the parietal cortex, striatum, thalamus, hippocampus, and cerebellum at the 160 ppm dose were increased 2.3-fold, 3.6-fold, 4.2-fold, 2.7-fold, and 2-fold. At 320 ppm in the same regions the increases were 3.4-fold, 5.5-fold, 6.2-fold, 3.7-fold, and 3.0-fold in the lead-treated rats compared with the values obtained in the control animals (Fig. 4).

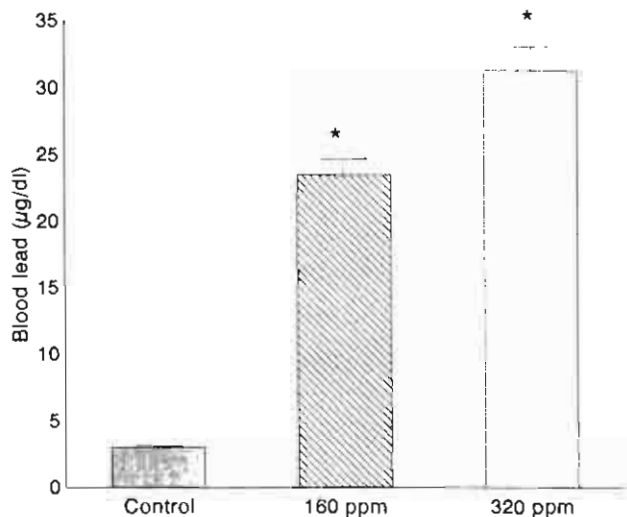


FIG. 1. Lead levels in the blood of rats exposed prenatally to either 160 or 320 ppm of lead acetate. Each bar represents the mean \pm SEM of 10 independent experiments. * $p < 0.01$ in respect to the control group; analysis of variance followed by the Tukey test.

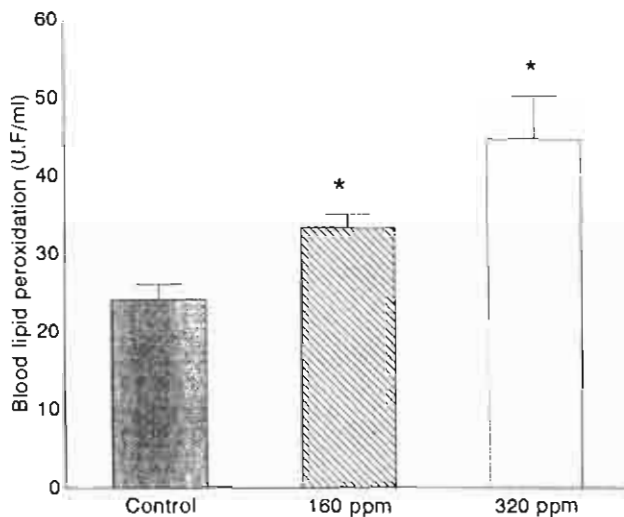


FIG. 3. Lipid peroxidation in blood. Each bar represent the mean \pm SEM of 10 independent experiments. * $p < 0.01$ in respect to the control group; analysis of variance followed by the Tukey test.

DISCUSSION

The blood Pb concentration only reflects freely accessible lead and greater quantities with toxic potential may reside in body organs [7]. In the present study, after lead treatment the blood lead levels were markedly increased in a dose-dependent manner in the developing rats treated with 160 and 320 ppm of lead in respect to

control values. These blood lead levels were similar to those obtained in previous experiments [6,11].

Our data indicate that lead is highly concentrated with little regional difference in all areas examined (cortex, striatum, thalamus, hippocampus, and cerebellum), after treatment with both doses of lead acetate. Our results are similar to previous studies showing marked accumulation of lead in several brain regions

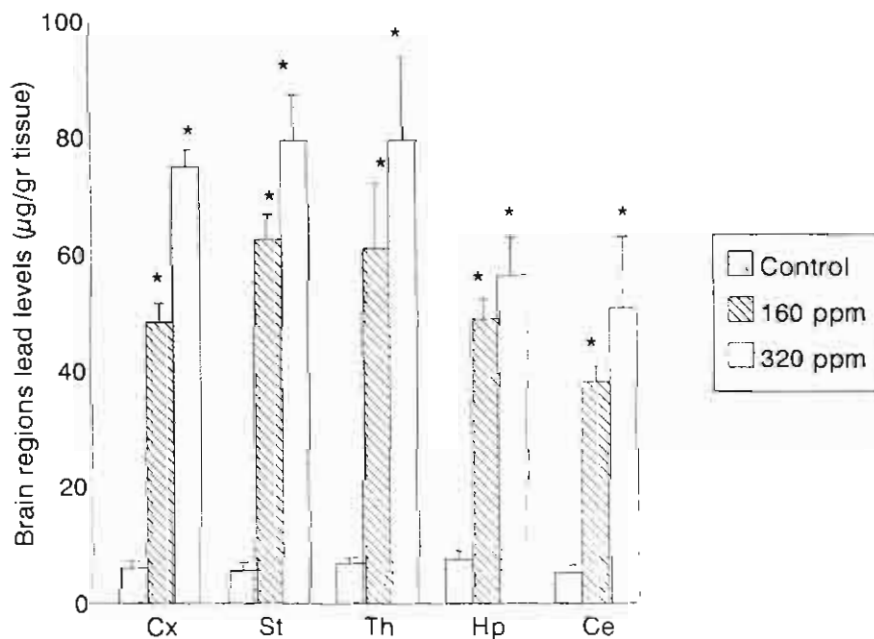


FIG. 2. Lead content in brain regions of rats exposed prenatally to either 160 or 320 ppm of lead acetate. All regions showed statistically significant differences between treated and control values. Each bar represent the mean \pm SEM of 10 experiments. * $p < 0.01$ in respect to the control group; analysis of variance followed by the Tukey test. Abbreviations: Ce, cerebellum; Cx, parietal cortex; Hp, hippocampus; ST, striatum; Th, thalamus.

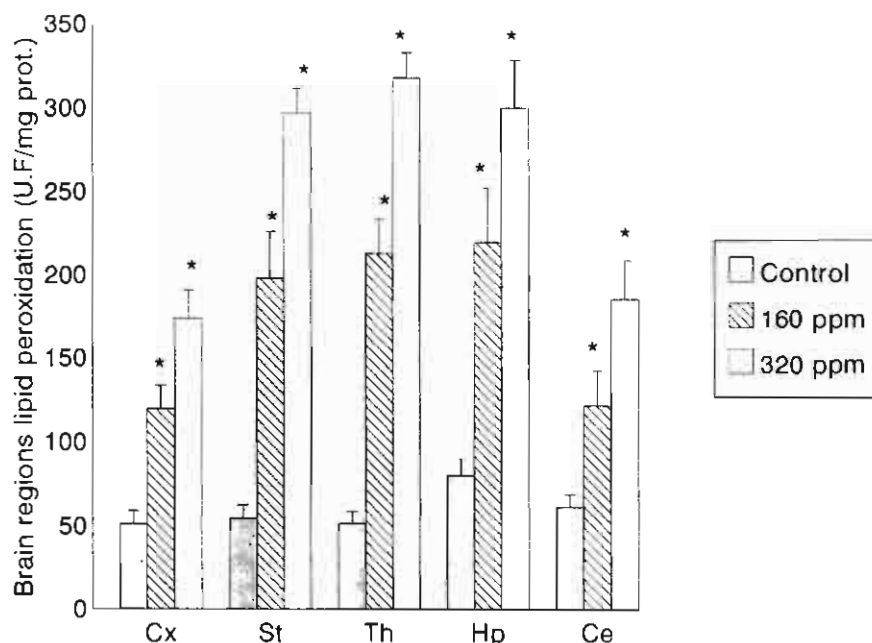


FIG. 4. Brain regional lipid peroxidation. All regions showed a significant difference between exposure groups and control values ($*p < 0.01$, analysis of variance followed by the Tukey test). Each bar represents the mean \pm SEM of 10 independent experiments. Abbreviations: Ce, cerebellum; Cx, parietal cortex; Hp, hippocampus; St, striatum; Th, thalamus.

[23]. We also found a significant association between lead in the blood and lead in brain regions.

Oxidative damage associated with the presence of lead in the brain has been proposed to indicate a possible role of free radicals in the pathogenesis of lead toxicity [1]. In addition, it has been proposed that the hematological system is an important target of lead-induced toxicity [17]. Recent studies suggested that red blood cells have a high affinity for lead and typically contain a majority of the lead found in the blood stream [17]. In the present work, we also found that low concentrations of lead are capable of increasing LFP formation in the blood.

Lead-stimulated lipid peroxidation *in vivo* resulted in the formation of aldehydic by-products, which in turn caused a decrease in reduced glutathione content [17]. In fact, the increased LFP detected in the blood of lead-treated rats in the present study confirms previous results [20] found in incubation of human whole blood in the presence to lead acetate and studies made by Hande et al. [17].

The content of lead in the blood was found to be correlated with oxidative stress in association with brain alterations. Studies in experimental animals have reported that lead alters oxidative metabolism and enhances lipid peroxidation, directly or indirectly [2]. Ding et al [9] reported that lead exposure promotes hydroxyl radical generation and induces oxidative stress in endothelial cells. Both lead and cadmium have been reported to enhance lipid peroxidation through inhibition of superoxide dismutase in all brain regions [27,28]. Our results indicate that lead caused dramatic changes in oxidative stress in all brain regions studied, particularly in the hippocampus, thalamus, and striatum. However, this enhancement did not merely reflect lead accumulation because the oxidative potential is probably different in the various brain regions tested.

In conclusion, our results show the toxic effects in brain of

rats exposed prenatally to lead acetate in relationship with induced oxidative stress.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Leticia Andrés Martínez for their technical assistance. This work was supported by CONACYT (119033/120845) fellowship to Juana Villeda-Hernández.

REFERENCES

- Adonaylo, V. N.; Oteiza, P. I. Lead intoxication: Antioxidant defences and oxidative damage in rat brain. *Toxicology* 135:77-85; 1999.
- Antonio, M. T.; Copras, I.; Leret, M. L. Neurochemical changes in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicol. Lett.* 104:1-9; 1999.
- Bressler, J. P.; Goldstein, G. W. Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 41:479-484; 1991.
- Bruning, J. L.; Kintz, B. L. *Computational handbook of statistics*, 2nd ed. Glenview, IL: Scott, Foresman & Co.; 1977.
- Christan, G. D. Medicine, trace metals and atomic absorption spectroscopy. *Ann. Chem.* 41:24A-40A; 1969.
- Claudio, L.; Lee, T.; Wolff, M. S.; Wetmore, J. G. A murine model of genetic susceptibility to lead bioaccumulation. *Fundam. Appl. Toxicol.* 35:84-90; 1997.
- Cohen, M. M. Biochemical aspects of lead neurotoxicity. In: Vinken, P. J.; Beuyn, G. W., eds. *Intoxications of the nervous system*, part I. Amsterdam: North-Holland Publishing Company; 1989:62-72.
- Davis, J. M.; Otto, D. A.; Weil, D. E.; Grant, L. D. The comparative developmental: Neurotoxicity of lead in humans and animals. *Neurotox. Teratol.* 12:215-229; 1990.
- Ding, Y.; Gonick, H. C.; Vaziri, N. D. Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. *Am. J. Hypertens.* 13:552-555; 2000.
- Flowler, B.; Bellinger, D.; Chisolm, J.; Falk, H.; Hegai, A. R. Mea-

- suring lead exposure in infants, children, and other sensitive populations. Washington, DC: National Academy Press; 1993.
11. Garcia-Arenas, G.; Claudio, L.; Pérez-Severiano, F.; Ríos, C. Lead acetate exposure inhibits nitric oxide synthase activity in capillary and synaptosomal fractions of mouse brain. *Toxicol. Sci.* 50:244–248; 1999.
 12. Glowinski, J.; Iversen, L. L. Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of ³H-norepinephrine, ³H-dopamine, and ³H-Dopa in various regions of the rat brain. *J. Neurochem.* 13:655–669; 1966.
 13. Goldstein, G. W. Development neurobiology lead toxicity; In: Needleman, H., ed. Human lead exposure. Boca Raton, FL: CRC Press; 1992:126–134.
 14. Goyer, A. R. Lead toxicity: Current concerns. *Environ. Health Perspect.* 100:177–187; 1993.
 15. Goldstein, G. W. Lead poisoning and brain cell function. *Environ. Health Perspect.* 89:91–94; 1990.
 16. Graff, W. J. Clinical aspects of lead poisoning. In: Vinken, P. J.; Beuyn, G. W., eds. Intoxications of the nervous system, part 1. Amsterdam: North-Holland Publishing Company; 1989:1–34.
 17. Gurer, H.; Ozgunes, H.; Neal, R.; Spitz, D. R.; Ercal, N. Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed. *Toxicology* 128:181–189; 1998.
 18. Hernández-Avila, M.; Romieu, I.; Ríos, C.; Rivero, A.; Palazuelos, E. Lead-glazed ceramics as major determinations of blood lead levels in Mexican women. *Environ. Health Perspect.* 94:117–120; 1991.
 19. Hirano, A.; Iwata, M. Neuropathology of lead intoxication. In: Vinken, P. J.; Beuyn, G. W., eds. Intoxications of the nervous system, part 1. Amsterdam: North-Holland Publishing Company; 1989:35–63.
 20. Hunaiti, A. A.; Soud, M. Effect of lead concentration of the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood. *Sci. Total Environ.* 248:45–50; 2000.
 21. Lowry, O. H.; Rosebroug, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275; 1951.
 22. Lunec, J.; Dormady, L. Fluorescent lipid-peroxidation products in synovial fluid. *Clin. Sci.* 56:53–59; 1978.
 23. Needleman, H. L. Human lead exposure. Boca Raton, FL: CRC Press; 1989:126–136.
 24. Norton, S. Toxic responses of the central nervous system. In: Klassen, C.; Doull, J.; Amdur, M., eds. Cassarett and Doull's toxicology. Elmsford, NY: Pergamon Press; 1985:359–386.
 25. Miller, D.; Paschal, D.; Gunter, E.; Stroud, P.; D'Angelo, J. Determination of lead in blood using electrothermal atomisation atomic absorption spectrometry a l'vov platform and matrix modifier. *Analyst* 112:1701–1704; 1987.
 26. Ríos, C.; Galván-Arzate, S.; Tapia, R. Brain regional thallium distribution in rats acutely intoxicated with TL2SO4. *Arch. Toxicol.* 63:34–37; 1989.
 27. Shukla, G. S.; Hussain, T.; Chandra, S. V. Possible role of regional superoxide dismutase activity and lipid peroxide levels in cadmium neurotoxicity: In vivo and in vitro studies in growing rats. *Life Sci.* 41:2215–2221; 1987.
 28. Skoczynska, A.; Smolik, R.; Jelen, M. Lipid abnormalities in rats given small doses of lead. *Arch. Toxicol.* 97:200–204; 1990.
 29. Sundstrom, R.; Muntzing, K.; Kalimo, H.; Sourander, P. Changes in the integrity of the blood-brain barrier in suckling rats with low dose lead encephalopathy. *Acta Neuropathol.* 68:1–9; 1983.
 30. Santamaría, A.; Ríos, C. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci. Lett.* 159:51–54; 1993.
 31. Triggs, W.; Wilmore, L. J. In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J. Neurochem.* 42:976–980; 1984.
 32. Wells, G. A. H.; Howell, J. M. C.; Gopinanth, C. Experimental lead encephalopathy of calves. Histological observations on the nature and distribution of the lesions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2:175–190; 1976.

Efectos neurotóxicos en niños intoxicados con plomo

Juana Villeda-Hernández

El plomo (Pb) es tóxico y el más blando de todos los metales, los efectos tóxicos del Pb han sido conocidos desde tiempos ancestrales. El humano siempre ha estado expuesto a los metales pesados que se encuentran en el entorno. Las zonas con concentraciones altas, la contaminación del ambiente y los alimentos tal vez fue lo que ocasionaron las primeras intoxicaciones causadas por el Pb. En el siglo XVIII fue reconocida la enfermedad como plumbismo crónico por lo general era causado por los vinos alterados con Pb, y fueron descritas las primeras alteraciones en el sistema nervioso. Tanquerel (1839) hizo un tratado con las primeras descripciones de la intoxicación con Pb. Hipócrates, Nicander, Celsus, Dioscorides, Galen, Aretaeus, y Paúl de Aegenina, describen y no sólo mencionan cólicos, sino también parálisis y dolor en las extremidades; sin embargo, poco se dice de los efectos del Pb en otros órganos. La población más susceptible son los niños, de manera importante los que empiezan a caminar, los que están en periodo neonatal y los aún no nacidos. Hasta 1925 los síntomas (anemia, nefritis y encefalopatía), encontrados en niños fueron asociados con la ingestión de Pb, por el consumo de hojuelas de pintura que contenían sales de Pb. En la actualidad el Pb esta ampliamente distribuido en forma natural y como consecuencia, su empleo industrial. Las principales fuentes de exposición al Pb son: por medio de los alimentos, la industria el medio ambiente. La absorción por vía gastrointestinal varía con la edad, los adultos absorben un promedio de 10% del Pb que ingieren mientras, que los niños pueden absorber hasta un 40%. Por vía respiratoria se absorben alrededor de un 90% de las partículas de Pb inhaladas del aire. El Pb absorbido pasa a través del transporte activo y pasivo a la pared intestinal y es solubilizado en el jugo gástrico y subsecuentemente absorbido en el intestino delgado, por último

pasa a la corriente sanguínea. El Pb es excretado a través de la orina, saliva y en mayor cantidad por la bilis y heces fecales, también por la leche materna. Los niños con niveles bajos de Pb en sangre de $<30 \mu\text{g/dl}$ presentan déficit en memoria, aprendizaje, conducta e inteligencia. Por éstos antecedentes la neurotoxicidad producida por Pb es un problema serio de salud pediátrico.

Palabras clave: plomo, aprendizaje, memoria, conducta, neurotoxicidad,

ABSTRACT

NEUROTOXIC EFFECTS IN CHILDREN INTOXICATED WITH LEAD

Lead (Pb++) is a toxic and is the more soft of the heavy metals, toxic effect of lead have been know since ancient times. Colica Pictonum was a frequent, widespread, and sometimes deadly disease that appeared in regards many parts of Europe from times until the 18th century. It was eventually recognized as chronic plumbism, usually caused by lead-adulterate wines, and several early descriptions of disturbances of the central nervous system. According to Tanquerel (1839) whose monumental treatise on lead poisoning remains the definitive link with the past, lead colic was know to virtually all ancient physicians including Hippocrates, Nicander, Celsus, Dioscorides, Galen, Aretaeus and Paul of Aegenina. Their description mentions not only colic but also paralysis and pain in the extremities. However, little was said of its effects on the other organs, most importantly, hematopoietic effects of lead have assumed a prominent place in evaluation and early diagnosis of exposed patients, the most susceptible population are children, particularly toddlers and infants in the neonatal period and the unborn fetus. The syndrome of childhood lead poisoning anemia, nephritis and encephalopathy was not described as such until 1925. The principal route of exposure is food, but it is usually environmental and presumably controllable source that produce exposure and toxic effect, these sources include lead-based indoor paint in old welling, auto exhaust or industrial of lead paint

Recibido: febrero 13 2002 Aprobado: 15 marzo 2002.

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Correspondencia: Juana Villeda-Hernández. Lab. de Enfermedades Neurodegenerativas. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez. Insurgentes Sur # 3877. Col. La Fama 14269 México, D.F.

chips, Hand to mouth activities of young children living in polluted environment, and less commonly, lead dust. The absorption of lead by via gastrointestinal in adults is approximately 10% and in children about the 40%. The absorption through the lungs may be until 90% of inhaled lead. Of ingested lead is apparently transported both passively and actively across the intestinal wall, the salts are solubilized in gastric acid and subsequently absorbed in the small bowel until plasma. The lead is excreted through kidney, stool, hez faecal and saliva also. Lead is a toxic heavy metal, which induces a broad range of physiological, biochemical and behavioral dysfunctions. The children with levels <30 µg/dl of lead showed, behavior, memory, learning and intelligence deficits.

Key word: lead, behavior, memory, neurotoxicity.

El Pb es uno de los metales más antiguos existentes de la humanidad y ha sido usado a través de la civilización humana, desde los egipcios, griegos, hindúes, chinos y mexicanos¹. Se encuentra en forma sólida o en partículas de dióxido de plomo o bien en combinación con otros metales en una gran variedad, así como en cosméticos, armas y materiales de construcción. Los romanos; sin embargo, usaron el Pb para los sistemas de red de agua². El uso del Pb declinó después de cuatro siglos AD hasta finales de la edad media cuando de nuevo se incrementó su uso en Oriente y Europa Central en loza de barro glaseado con sales de plomo. En el siglo XIX fueron agregadas sales de plomo a pinturas para darles brillo y aclarar los pigmentos y prolongar así la vida de las cubiertas pintadas, y se ve aumentada la producción a finales del siglo XIX. Murozomi³ muestra el impactante incremento del Pb en el ambiente. No obstante, en los años 70s en USA y Reino Unido usan Pb para la fabricación de baterías y como aditivo en las gasolinas. El uso ha aumentado de manera considerable desde la época de los romanos hasta nuestros días¹.

De acuerdo con Tanquerel (1839), Hipócrates, Nicander, Celsus, Dioscorides, Galen, Aretaeus, y Paúl de Aegina describen no solamente cólicos sino también parálisis y dolor en la extremidades; sin embargo, no se dice de los efectos en otros órganos. Laennec en 1831 describe a los pacientes que murieron por plumbismo como pálidos y delgados¹, con esto confirmaba las descripciones de Aub en 1926⁴, que disminuyen los eritrocitos en pacientes intoxicados con plomo, dándole gran importancia a los efectos del Pb en el sistema hematopoyético, teniendo un papel importante en la evaluación para el diagnóstico temprano de pacientes expuestos, particularmente niños. Hasta 192⁵ los síntomas (anemia, nefritis y encefalopatía) encontrados en niños fueron asociados con la ingestión del Pb por

el consumo de hojuelas de pinturas con sales de Pb.

Entre 1910 y 1925 se encuentran los primeros informes aislados de los efectos producidos por Pb. Ruddock en 1924⁵ lo nombra como síndrome a la intoxicación por Pb en niños, desde entonces con el auge industrial se tomaron medidas efectivas de higiene, y se vio disminuida la intoxicación por Pb en adultos; sin embargo, en niños se extiende en proporciones epidémicas, debido al fenómeno de la posguerra, por el deterioro urbano de áreas donde fueron usadas pinturas con sales de plomo⁶. Guine en 1972⁷ reporta a un grupo de niños australianos intoxicados con sales de Pb en pinturas, siendo los primeros casos notables. Aunque la mortandad tanto de niños como de adultos ha disminuido, el Pb es una sustancia tóxica por el uso inadecuado, siendo una fuente significativa de morbilidad en el hombre¹.

Fuentes de exposición y usos del plomo

El Pb es un metal que por sus propiedades fisicoquímicas ha sido utilizado ampliamente por el hombre a través del tiempo. Las principales fuentes de exposición al Pb se encuentran en el ambiente ocupacional y el ambiente general. A las fuentes de contaminación ocupacional pertenecen los procesos de industrialización (fundición y refinación) del Pb, los cuales emiten cantidades importantes de este metal al medio ambiente⁸ y las actividades de minería. Es importante mencionar que los procesos de fundición del metal presentan mayor riesgo para la salud de los trabajadores, ya que durante esta actividad el Pb calentado desprende vapores con partículas de un diámetro menor a 5 µm, lo que hace posible que al ser inhaladas se depositan en las vías respiratorias⁹.

Las principales fuentes de contaminación en el ambiente general son las mismas que las de la contaminación ocupacional y los procesos de la combustión de la gasolina. Estos liberan a la atmósfera partículas finas de hidrocarburos, haluros, óxidos y carbonatos de Pb¹⁰ las cuales dependiendo de su tamaño pueden penetrar con facilidad al aparato respiratorio y ser absorbidas por el organismo. Los valores permisibles por la Norma Mexicana para el Pb atmosférico son de 1.5 mg/m³, aunque en ciudades con gran actividad industrial y vehicular como el D.F., las concentraciones de Pb en el medio ambiente pueden ser mayores a las permisibles^{11,12}.

La contaminación de los alimentos con Pb la producen los objetos de cocina, en México se utiliza comúnmente el vidriado con Pb para cubrir utensilios de cerámica para cocinar, almacenar o servir agua y alimentos. Esta loza tradicional se endurece a bajas tem-

peraturas, por lo cual el Pb permanece en el vidrio y puede ser liberado en la comida o bebida, en especial si son ácidos^{13,14,15}. Los alimentos también pueden contaminarse con Pb antes de ser procesados. Se ha observado un alto contenido de Pb en vegetales cultivados en jardines urbanos, cuando la tierra contiene un alto porcentaje de Pb en el aire o en el agua con que se irrigan¹⁶. Un estudio en Tula, Hidalgo mostró un considerable contenido de Pb en vegetales regados con aguas residuales con un rango de 0.14-3.74 mg/kg¹².

Los cigarros son otra fuente potencial de exposición a Pb, el contenido de Pb en cigarrillos mexicanos es de 0.91-41.690 mg/kg, estos resultados nos indican que fumar es un factor de riesgo¹².

Otras fuentes de exposición al Pb en concentraciones variables en el ambiente general las constituyen los suelos, el tabaco, las pinturas de las paredes de las casas, sobre todo en los niños⁹. Algunos cosméticos, tales como los delineadores o sombras para párpados contienen Pb y pueden ser fuentes de exposición al Pb si se usan con frecuencia^{1,17}.

Aspectos clínicos de la intoxicación por plomo

Absorción

Las principales vías de absorción del Pb son el tracto gastrointestinal y el sistema respiratorio. El grado de absorción depende de varios factores entre los que se encuentran: el tamaño de las partículas, forma química, la solubilidad, el estado nutricional y la edad del sujeto expuesto^{18,19}. Se estima que la ingesta diaria de Pb en la población no ocupacionalmente expuesta varía de 20 a 400 µg diarios¹⁶ y la absorción de Pb es mayor en los niños (en especial lactantes) que en los adultos²⁰.

La absorción gastrointestinal en adultos es alrededor de 10% de Pb ingerido, mientras que en los niños absorben hasta un 40%. La absorción del Pb inhalado depende de las concentraciones o volumen de aire respirado por día y la forma (vapor o partículas).

Se puede absorber alrededor de 90% de Pb inhalado del aire ambiental^{17,21}. Una vez que el Pb es inhalado a través del tracto respiratorio, una porción de las partículas inhaladas pasa al esófago y se absorben parcialmente (10-15%) en el aparato gastrointestinal.

Las partículas depositadas en los alveólos pulmonares restantes, se absorben y pasan al torrente sanguíneo, en donde se une a la hemoglobina de los eritrocitos, para ser transportado y distribuido a los diferentes órganos y tejidos del organismo¹⁹, se distribuye de manera inicial en los tejidos blandos, en particular el epitelio tubular renal, el hígado y el sistema nervioso, luego el Pb es distribuido y depositado en hueso, dien-

tes y pelo²². Con el tiempo, en el hueso se encuentra cerca del 95% de la carga corporal del metal, sólo pequeñas cantidades de Pb inorgánico se acumulan en el cerebro, la mayor parte en la sustancia gris y en los ganglios basales²³.

La absorción puede incrementarse con dietas pobres en calcio, hierro y/o proteínas²⁴. Sólo el Pb orgánico (tetraetilo) es absorbido a través de la piel, pero puede ser una vía significativa en trabajadores expuestos que no tengan protección adecuada¹.

Metabolismo

El Pb ingerido, se distribuye en el organismo, por medio de transporte activo y pasivo a través de la pared intestinal por mecanismos específicos. Las sales de Pb son solubilizadas en el ácido gástrico y subsecuentemente absorbidos en el intestino delgado, de la corriente sanguínea pasa hacia el plasma, y la concentración se mantiene relativamente constante¹. Se ha encontrado en el torrente sanguíneo alrededor del 90% de Pb asociado con los eritrocitos; sin embargo, el transporte del Pb no es muy claro, al final el Pb es encontrado en la membrana y citoplasma de los eritrocitos, aparentemente asociado con polipéptidos de peso molecular bajo^{1,25}. Los factores que intervienen para la liberación del Pb de las membranas de los eritrocitos no se conocen, pero el Ca⁺⁺ juega un papel muy importante¹. Del torrente sanguíneo el Pb pasa a hueso donde se almacena por muchos años²⁶ y otros órganos como: riñón, hígado y tejido nervioso y en pequeñas cantidades se han encontrado en miocardio, gónadas y glándulas salivales¹.

Excreción

El Pb es eliminado del organismo en especial por dos vías: por heces y orina; también es excretado en la leche materna, la vida media del Pb en el organismo en general es larga y depende del tejido donde se haya depositado^{9,19}. La excreción urinaria varía con el fluido del plasma renal. El Pb es filtrado a los glomérulos y por transporte activo pasa a los túbulos, produciendo en niños nefritis. Los rangos de la excreción urinaria del Pb esta entre 10-80 µg/día, se ha considerado como una evidencia excesiva de la absorción de Pb, si la excreción urinaria por 24 horas es mayor de 100 µg¹.

La otra ruta de excreción del Pb es en el tracto gastrointestinal, el volumen de Pb en heces es absorbido antes de ser excretado por el sistema biliar, sólo el Pb que es transportado por eritrocitos es excretado por la biliis. Esta ruta puede aumentar por el uso de BAL un agente quelante el cual es selectivo para remo-

ver el Pb en los eritrocitos y se incrementa la excreción por la bilis¹.

Toxicidad sistémica del plomo

El Pb es un agente tóxico que se acumula de manera progresiva en el organismo ocasionando daño en diferentes órganos y sistemas, produciendo así una variedad de signos y síntomas que dependen del tipo de intoxicación¹⁷.

Las intoxicaciones agudas son raras y es consecuencia de la ingestión de compuestos solubles en ácido o inhalación de vapores del mineral. Los efectos locales en la boca incluyen notable astringencia, sed y regusto metálico, después surge náusea, dolor abdominal y vómito¹. Este último puede ser de aspecto lácteo, por la presencia de cloruro de Pb, el excremento puede tener color negro por el sulfuro de Pb y a veces hay diarrea o estreñimiento.

Si se absorben rápidamente grandes cantidades de Pb puede surgir un síndrome de choque, como consecuencia de la pérdida masiva de líquidos en vías gastrointestinales¹⁷. Hay anemia por una crisis hemolítica aguda. Entre los síntomas agudos del sistema nervioso están: parestesias, dolor y debilidad muscular.

La intoxicación crónica (saturnismo o plumbismo) se puede dividir en varias categorías: gastrointestinales, neuromusculares, del sistema nervioso central, hematológicos, renales y de otra índole. Por lo general, las alteraciones neuromusculares y del sistema nervioso central resultan de la exposición intensa, mientras que el abdominal es una manifestación más común de una intoxicación de desarrollo muy lento e insidioso.

Las alteraciones del sistema nervioso suelen ser más frecuentes entre niños, mientras que el gastrointestinal prevalece en los adultos¹⁷.

La placenta es un órgano accesible por el cual el Pb puede atravesar de la madre al feto desde las primeras semanas de la gestación^{27,28}. La alta sensibilidad del feto a los efectos tóxicos del Pb se debe a la inmadurez de la barrera hematoencefálica²⁹ y la susceptibilidad del desarrollo del sistema nervioso durante la prematura modificación y estructura del circuito neuronal^{30,31}, la habilidad del Pb para competir con el Ca⁺⁺ y activar las proteínas cinasas puede alterar la conducta de las células endoteliales en el cerebro inmaduro y alterar la barrera. El efecto del Pb es directo sobre las células endoteliales, pero actúa de forma indirecta en los microvasos por el daño a los astrocitos que proporcionan señales para mantener la integridad de la barrera hematoencefálica^{32,33}. Estudios hechos por autorradiografía muestran que el Pb atraviesa la barrera

hematoencefálica a través de las prolongaciones de los astrocitos y el espacio perivascular³⁴, por lo tanto, el Pb en sistema nervioso central en desarrollo puede causar alteraciones en la función de la barrera hematoencefálica, la presencia de pequeñas lesiones hemorrágicas con daño focal de los vasos como eventos cruciales en la patogénesis de la encefalopatías de ratas lactantes³⁴.

Evidencias experimentales indican que el cerebro fetal tiene una gran sensibilidad al Pb³⁵ y es en particular vulnerable a la exposición de ciertos metales durante la gestación y pueden provocar anomalías en el feto, como abortos espontáneos, pérdida fetal y neonatal en humanos y efectos embrio y fototóxicos en animales³⁶, malformaciones esqueléticas retardando el crecimiento³⁷ también se han reportado retardo en la migración neuronal y espinas dendríticas causando retraso mental. La exposición puede ser a través de la madre por medio de la leche materna³⁰.

Hay evidencias que en animales jóvenes desarrollan encefalopatía durante los primeros días de vida y la neurotoxicidad inducida por el Pb se produce después de los 18-20 días de edad³⁵.

Los efectos tóxicos del Pb en los niños es en esencia en el sistema nervioso central, en gran parte por la falta de madurez de la barrera hematoencefálica, la cual permite el paso del Pb hacia el encéfalo. Se han observados síntomas clínicos en niños que van desde ataxia hasta coma y convulsiones que en ocasiones pueden ser fatales, los niños que sobreviven a esto pueden tener retraso mental, convulsiones y ataques epileptiformes cuando las concentraciones en sangre llegan hasta 80 µg/dl o más³⁵ se ve afectado su coeficiente intelectual cuando están expuestos a bajas concentraciones, observándose también retraso en el proceso de aprendizaje y memoria^{35,38}.

Los niños con concentraciones de plomo en sangre mayores de 10 µg/dl están en peligro de mostrar discapacidades en su crecimiento, en los adultos con valores menores de 30 µg/dl no presentan lesiones funcionales, ni síntomas manifiestos; sin embargo, pueden tener una disminución neta en la actividad de la dehidratasa alfa-amino-levulinico (-ALA) y se produce un incremento leve en la excreción de la δALA por la orina y un aumento en la porfirina eritrocítica^{17,39}.

Efectos conductuales producidos por plomo

Investigaciones epidemiológicas han asociado la exposición tóxica de Pb con el deterioro de las funciones cognitivas, conductuales, la maduración y desarrollo de los niños⁴⁰.

Estos efectos han ocurrido en la ausencia de signos característicos de la toxicidad y sin alguna altera-

ción aparente en la morfología del sistema nervioso o función neurológica generalizada⁴¹. A estos efectos se les ha considerado como un significativo problema de salud pública pediátrica⁴².

El síndrome del SNC se ha denominado encefalopatía saturnina o por Pb. Es la manifestación más grave de esta intoxicación y mucho más frecuente en niños. En ocasiones la exposición a Pb ocasiona un deterioro psíquico definido y agresivo en niños con una evolución de los primeros 12-18 meses de vida, seguido de una pérdida impecable de sus capacidades motoras y del habla, pueden mostrar hiperexcitabilidad intensa, conducta agresiva y un cuadro convulsivo de difícil control¹⁷. Clínicamente la encefalopatía puede ocurrir en niños con altos niveles de Pb en sangre de aproximadamente 80 µg/dl^{1,22}.

Los síntomas empiezan con letargia, irritabilidad, pérdida de apetito, disinesia, ataxia y se reducen los niveles de la conciencia, la cual puede progresar a coma y muerte²². Needleman⁴² reporta a niños sin síntomas de toxicidad de Pb, pero con elevados niveles de Pb presentan déficit psicométrico, en su coeficiente intelectual, y en el lenguaje²². Los niveles moderados de Pb en sangre (40-80 µg/dl) se han observado mínimas alteraciones cerebrales, hiperactividad y autismo⁴³.

La exposición del Pb durante la niñez causa deterioro en las funciones neuroconductuales incluyendo la disminución del coeficiente de inteligencia (IQ) aunque varía con la posición socioeconómica y el sitio de residencia⁴⁴ se estima que el periodo que podría afectar más al niño expuesto a Pb es desde el nacimiento hasta aproximadamente a los 4 años de edad⁴⁵. Estudios de cohorte hechos en dos ciudades de EUA en niños menores de 11 años, revelan una asociación entre el Pb y IQ, cuando los niveles de Pb encontrados están entre 15-30 µg/dl en sangre el IQ se reduce de 1-2 puntos, con niveles de 20-50 µg/dl en sangre el IQ disminuye 4 puntos^{38,44} y de 50-70 µg/dl baja 5 puntos, también se observó una disminución en el razonamiento del vocabulario y el enlace de frases gramaticales. Haciendo un seguimiento de estos niños hasta los 13 años se sigue observando una disminución de IQ⁴³.

Estudios en animales experimentales confirman que la disminución de IQ es muy similar a los resultados encontrados en estudios hechos en humanos. Se estima que en 1990 aproximadamente el 6% de niños en EUA entre los 5 años de edad tienen más riesgos y presentan mayores complicaciones en el bienestar del desarrollo conductual⁴³.

La falta de percepción sensorial impide de manera importante el aprendizaje cuando las concentraciones de Pb rebasan los 60 µg/dl en sangre entera. Los niños expuestos a largo plazo a Pb en poca cantidad

en sus alimentos, en el aire que respiran, en la tierra y el polvo en sus zonas de juego, cuando rebasan concentraciones de Pb arriba de 25 µg/dl en sangre pueden causar una intoxicación sutil del SNC que incluye discapacidades de aprendizaje, menor coeficiente intelectual y anomalías en la conducta¹⁷. Exposición prolongada al Pb puede causar alteraciones en el aprendizaje, aumentando su conducta hiperexcitabilidad⁴², y disminuye el coeficiente intelectual de los niños con concentraciones sanguíneas de Pb de 30-50 µg/dl. Las alteraciones neurológicas graves como la encefalopatía saturnina (torpeza, vértigo, ataxia, cefalea, insomnio, inquietud e irritabilidad, convulsiones y coma), se ha observado con mayor frecuencia en la población infantil menores de 10 años^{17,22}. Estudios hechos en animales han reportado efectos similares a los encontrados en humanos aunque han sido complejos los procesos de cognición y aprendizaje han sido evaluados^{46,47}, a exposiciones de niveles bajos de Pb se han observado los efectos del Pb en diferentes especies entre 10-15 µg/100ml de Pb en sangre en niños^{48,49}, de <15 µg/100ml Pb en sangre en primates^{50,51} y < 20 µg/100ml de Pb en sangre en ratones⁵² los efectos del Pb en las funciones cognitivas son similares en las tres especies estudiadas⁴¹. En la última década se han hecho numerosos estudios para investigar los efectos del Pb en las alteraciones cognitivas utilizando potenciación a largo plazo (LTP) y correlacionar la habilidad del aprendizaje. Se ha visto que la exposición a Pb en las primeras etapas del desarrollo, aparte de otros efectos en la conducta, se ha observado agresividad en ratones.

Estudios hechos en monos infantes con niveles de Pb de >500 µg/dl en sangre, se reduce la interacción social, y presentan agresividad, se quedan más tiempo en un lugar⁵³. Con niveles más bajos entre 30-100 µg/dl en sangre se encontró represión en la actividad de juego con numerosas alteraciones conductuales cuando su ambiente cotidiano es alterado, estos efectos dependen del momento y duración de exposición³⁸.

A las alteraciones en el lenguaje se les ha dado poca importancia, análisis por ultrasonido de vocalización en ratas infantes en respuesta a estrés producido por frío y expuestas a Pb, mostraron retraso en el desarrollo termorregulador³⁸.

Trabajos hechos por el grupo de Wisconsin⁵³⁻⁵⁵ en monos expuestos perinatalmente a Pb y valoraron un año de edad, para observar su habilidad de percepción de los reflejos en los potenciales evocados auditivos, observando que baja la capacidad de discriminar estas señales, y retardan el desarrollo en la función cortical y están consistentes con la mirada y la recepción del lenguaje³⁸. También se ha observado deficiencia en el sistema visual y auditivo, con alteracio-

nes en la función motora como desequilibrio en la postura. Por lo tanto, el deterioro en la conducta puede contribuir a problemas cognoscitivos⁴⁴. Estudios hechos por Lasley⁴¹ en un modelo aceptado para observar memoria y aprendizaje por medio de potenciación a largo plazo (LTP) en hipocampo, este es caracterizado por un incremento en la eficacia sináptica, seguido de una liberación debido a una corta estimulación, y los resultados sugieren que el hipocampo es la región más susceptible cuando la exposición a Pb se inicia después del nacimiento hasta el destete de las crías y a niveles bajos de exposición, se observó una disminución en la incidencia de LTP en la región CA1 y giro dentado, se eleva el umbral por la inducción y se reduce la magnitud de potenciación⁵⁶; sin embargo, cuando la exposición es durante la gestación los efectos son más visibles. Estas observaciones confirman que el LTP puede ser con facilidad afectado por la exposición a niveles bajos de Pb y durante las primeras etapas del desarrollo, aunque algunos efectos no son observables, la función del SNC en niños parece ser en forma global afectado, principalmente las áreas corticales y el hipocampo⁵⁷. Hay una relación importante entre los cambios inducidos por el Pb en los neurotransmisores y las alteraciones en el aprendizaje, sistema dopaminérgico, colinérgico y glutamatérgico. Previa evidencia reportan que el Pb en el sistema dopaminérgico altera la síntesis y la liberación de la dopamina en la presinápsis, disminuye así la transmisión sináptica en nervio periférico, la alteración del sistema mesolímbico producido por el Pb no proporciona una evidencia directa en el involucramiento de los cambios en el sistema dopaminérgico inducidos por el Pb en las alteraciones del aprendizaje⁴⁴.

Levin⁵⁸ reporta que las alteraciones del sistema dopaminérgico están de forma directa relacionados con los cambios observados en la conducta y la memoria⁵⁹.

Numerosos estudios han demostrado que las alteraciones colinérgicas pueden alterar las vías cognoscitivas y de atención. El Pb induce una disminución en la liberación y así en la función colinérgica, en corteza, hipocampo, estriado, cerebro medio y estriado en ratas expuestas a Pb desde el nacimiento, se ha observado que hay un incremento en los receptores muscarínicos de forma importante en la postsinápsis⁴⁴.

La importancia del sistema glutamatérgico, en particular los receptores a NMDA ha sido asociada con potenciación a largo plazo (LTP) en la transmisión sináptica excitatoria y con los procesos de memoria y aprendizaje. La evaluación de la función presináptica de la sinapsis glutamatérgica de animales expuestos crónicamente a Pb, y puede estar relacionada con la disminución de la LTP, también se observó una disminu-

nución en la liberación del glutamato en animales con valores de 30-40 µg/100ml⁶⁰. Varias evidencias apoyan que la compleja función de los receptores NMDA en presencia de Pb inducen un déficit en el aprendizaje, es importante reconocer que las propiedades conductuales de los componentes glutamatérgicos en el aprendizaje no son invariantes; sin embargo, los agonistas y antagonistas de NMDA juegan un importante papel en el sistema de neurotransmisores cuando son alterados por Pb, alterando el aprendizaje, con otras manifestaciones conductuales^{41,44}. Se sabe que hay una interacción entre el sistema dopaminérgico, colinérgico y glutamatérgico, por lo tanto los efectos del Pb en el sistema dopaminérgico es un resultado indirecto de los efectos directos en el sistema glutamatérgico y los efectos indirectos en el sistema glutamatérgico son los efectos primarios del sistema dopaminérgico⁴⁴.

Los niños expuestos a bajas dosis de Pb les causa desorden en la conducta y el aprendizaje, desafortunadamente esto se debe a que la maduración y proliferación de las neuronas, se lleva a cabo después del nacimiento, las conexiones importantes para el aprendizaje, memoria y conducta son formados y extensivamente remodelados durante los primeros años de vida⁴¹.

Estudios realizados en México en 1981 se compararon la concentración de Pb en sangre materna con la de cordón umbilical; en el primer caso, la medida de Pb fue de 20.3 µg/dl, y la del cordón de 13.5 µg/dl. En 1990 se demostró que los niveles de Pb van de 10-25 µg/dl en cordón se asocian con el desarrollo mental del niño en sus primeros dos años de vida. Por otro lado, se encontró que las usuarias de loza de barro vidriado, cocido a baja temperatura, tienen niveles de Pb significativamente más altos a lo largo de su embarazo que las no usuarias diferencia que puede llegar hasta un 50%.

En 1992 se identificó como principal predictor de niveles de Pb, el lugar de procedencia. Los niños que vivían en avenidas poco transitadas o en zonas residenciales el Pb disminuye en un 27% con respecto a los niños que vivían en zonas urbanas o industriales. Se ha estimado que en México nacen anualmente alrededor de 11 000 niños con niveles de Pb superiores a 20 µg/dl, situación alarmante si se considera el riesgo de intoxicación por este elemento al que estarán sometidos durante sus dos primeros años de vida⁶¹.

En México se ha documentado que el 95% de los escolares tenían hasta hace pocos años concentraciones de Pb por arriba de 10 µg/dl, la sustitución gradual por gasolina sin Pb; la reglamentación en materia de fabricación y uso de loza vidriada, y el mejoramiento en el manejo de las pinturas, barnices, aditivos, láminas y tuberías de Pb con las que los menores entran

en forma directa en contacto, han logrado que los niveles de concentración de Pb en la sangre disminuyan de manera significativa.

No obstante, en la etapa preescolar y escolar, el desarrollo neurológico y cognoscitivo de los niños se asocia inversamente con la exposición al Pb durante la etapa prenatal y la infancia temprana. También, la concentración de Pb en sangre del cordón umbilical y durante los dos primeros años se relaciona de forma directa con la aparición de ciertas disfunciones neurofisiológicas.

Estos hallazgos han permitido inferir que la exposición temprana a dosis bajas de Pb interfiere con el pleno desarrollo de las potencialidades cognoscitivas de los niños. Se ha observado que los infantes registran la concentración más alta de Pb entre el primero y el segundo año de vida, y después desciende paulatinamente entre los seis y siete años⁶².

Albert *et al* en 1986⁶³ midieron los niveles de Pb en cabello de niños que vivían en diferentes zonas del país (México, D.F.; Puebla, Puebla; Tepeaca, Puebla; Gómez Palacio, Durango; y Torreón Coahuila.) observando que los niños que viven en D.F., Puebla y Gómez Palacio Durango.

Están más expuestos a la intoxicación crónica por Pb; sin embargo, los niños que habitan en Torreón el 66.7% de la población infantil presentan una elevada concentración (55 µg/dl) de Pb en su organismo.

Con estos resultados se debe prestar especial atención al problema de salud ambiental en la ciudad de Torreón.

Medidas de prevención

En 1991, el gobierno mexicano firmó un acuerdo de acciones conjuntas para la solución integral de los problemas relacionados con los productos que contienen plomo y que ponen en riesgo la salud humana y el ecosistema. Se formó un comité nacional de consulta para el establecimiento de normas de prevención del uso del plomo, bajo la coordinación de la Secretaría de Salud. Las normas de control de las diferentes fuentes de exposición a Pb son las siguientes:

Los pigmentos, vidriados y pinturas deben llevar una etiqueta con una leyenda preventiva, en caso de contener Pb.

El contenido de Pb, en juguetes, plumas, lápices de colores, plastilina, otros útiles escolares, cosméticos, muebles y pinturas para exteriores debe ser de <90mg/Kg.

El contenido de plomo en cerámica vidriada a altas temperaturas y utensilios de vidrio debe tener entre 2.5-7.0 ppm. Se ha prohibido el uso de pinturas que contienen óxidos y carbonatos de Pb, para las banque-

tas, carreteras y autopistas. Desde 1989 se prohibió en México el uso de insecticidas que contienen arsénico o Pb. Las industrias deben suspender el uso de latas soldadas con Pb, para alimentos y bebidas. La sustitución de hornos de leña de bajas temperaturas, en el proceso de producción cerámica vidriada por hornos de gas de alta temperatura, para evitar la liberación del Pb vidriado. La sustitución de vidriado de Pb por un vidriado sin Pb, no tóxico que tuviera las mismas características del vidriado de Pb⁶⁴.

Tabla 1. Acciones básicas de protección en niños menores de 15 años y mujeres embarazadas

Niveles de plomo en sangre (NPS)	Acciones
10 µg/dl Categoría I	Un individuo en esta categoría no se considera afectado
10-24 µg/dl Categoría II	Se repite la prueba de plomo en sangre venosa, al menos cada 6 meses después del primer resultado hasta disminuir a menos de 10 µg/dl, realizar una evaluación médica integral para disminuir el NPS, proporcionar a la familia educación sobre higiene personal y prevención de exposición al plomo y nutrición
25 µg/dl Categoría III	-Se repite la prueba de plomo en sangre venosa, inmediatamente después del primer resultado, para confirmar el nivel de plomo en sangre. - Realizar una evaluación médica integral por especialista para determinar el tipo de atención (recomendaciones higiénico-dietéticas, suplementos alimenticios de calcio y/o hierro) -Repetir pruebas de plomo en sangre venosa cada tres meses, hasta alcanzar la categoría II - Realizar determinación de niveles de plomo en sangre a las personas que conviven con el afectado. -Proporcionar a la familia educación sobre higiene personal y prevención de exposición al plomo y nutrición.
45-69 µg/dl Categoría IV	Además de lo señalado en la categoría III -Repetir pruebas de plomo en sangre venosa cada mes hasta que la concentración alcance la correspondiente a la categoría III - En caso de presentar sintomatología valorar tratamiento específico por médico especialista. El tratamiento debe aplicarse en un hospital -Realizar un seguimiento médico integral
>70 µg/dl Categoría V	Además de lo señalado en la categoría IV Un individuo en este nivel se debe considerar como CASO PARA ATENCIÓN MÉDICA INMEDIATA y ocasionalmente, de emergencia médica - Hospitalizar, evaluar por médico especialista y empezar INMEDIATAMENTE el tratamiento correspondiente previa identificación de la fuente -El tratamiento debe aplicarse en el hospital -Repetir pruebas de plomo en sangre venosa cada semana hasta que la concentración alcance la correspondiente a la categoría IV

Fuente: Diario Oficial de la Federación 25 de Junio de 1999⁶⁴.

Para el mejoramiento del ambiente en las grandes ciudades como la zona Metropolitana del Valle de México, Guadalajara, Monterrey, Edo. de México, Ciudad Juárez, y otras ciudades. A partir de 1997 ya no se distribuye gasolina con Pb, para disminuir la contaminación ambiental en relación con las muy severas contingencias; sin embargo, esta medida aún resulta insatisfactoria.

Esta prohibido la quema de residuos a cielo abierto. Se reglamentó con las empresas pedreras la reducción de emisión de partículas. Se hizo convenio con las maquiladoras la instrumentación del programa para la reducción de emisión de partículas: que PEMEX suministre gasolina mejorada, Fortalecer el programa de verificación vehicular, el mejoramiento del sistema de transporte público, reforestar y pavimentar calles, Impulsar la educación ambiental y la capacitación⁶⁵. En la actualidad se están realizando intensas labores para mejorar el entorno ecológico y la salud de la población de Torreón, Coahuila. Es así que Let Mex Peñoles permanece sujeta a la fase I del plan de contingencia ambiental que la obliga a operar en un 75% de su capacidad y aún se siguen rebasando los índices permisibles del Pb establecidos en la normatividad internacional. Existen varias instituciones donde se hace investigación tanto clínica como básica sobre los efectos del Pb en el sistema nervioso y otros órganos:

En la Universidad Nacional Autónoma de México en el departamento de Fisiología en la Facultad de Medicina. En la sección de estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del INP. El Hospital ABC de la Ciudad de México. El Instituto de Salud Pública de Cuemavaca, Morelos. El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

CONCLUSIÓN

Los niveles de Pb en sangre de niños varían de acuerdo a su nivel socioeconómico y el lugar de residencia, debido al grado de urbanización e industrialización, así como el tipo de industria, estas características influyen decisivamente en el contenido de Pb en el organismo de niños que residan en estas zonas.

Por lo tanto, los niños que viven en áreas urbanas en la República Mexicana están expuestos a la intoxicación crónica por Pb de origen ambiental que los que habitan áreas rurales y suburbanas. Aunque se han tomado varias medidas para disminuir la exposición de Pb, es urgente establecer políticas regulatorias estrictas de control de Pb para proteger a la población infantil.

Existe la necesidad de realizar programas de detección masivos en la población para estimar con mayor precisión la magnitud del problema.

REFERENCIAS

- Graff WJ. Clinical aspects of lead poisoning. In: Vinken PJ, and Beuyn GW. *Intoxication of the nervous system*. Parte 1., ed. North-Holland Publishing Company, Amsterdam-New York. Oxford, 1889.
- Giffillan SC. Lead poisoning and the fall of Rome. *J Occup Med*, 1965;7:53-61
- Murozomi M, Chow TJ, Patterson CC. *Geochim cosmochim Acta* 1999; 33:1247-56.
- Aub JC. *Lead poisoning in medicine monographs* Vol. II. Baltimore. MD, Williams and Wilkins, 1926.
- Ruddock JC. Lead poisoning in children with special reference to pica. *J Amer Med Ass* 1924;82:682-691
- Hardy H. Wath is the status of knowledge of toxic effect on identifiable groups in the population?. *Clin Pharmacol Ther*, 1966;7:713-22.
- Guinee VF. Lead poisoning. *Amer J Med* 1972; 283-8.
- Joint Program FAO/OMS. *CODEX alimentary norms for fruit juice of concentrated fruit nectar of fruits*. Codex Alimentaras, Vol. X, 1st ed. Rome: Food and Agricultural Organization, World Health Organization, 1995.
- Galvao AC, Corey G. *Serie vigilancia 8 plomo*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Mundial de la Salud. Metepec, 1989.
- Fuentes AL, Soto-Mora C. Influence of lead on pregnant women in metropolitan Mexico City. *Cont Toxicol* 1993;53:553-9.
- Avediz A. *Normal de la calidad de aire en México*. Secretaria de Desarrollo Urbano y Ecología, México, 1984.
- Romiew I, Palazuelos E, Hernández A, Ríos C, Muñoz I, Jiménez C, Caheron G. Sources of lead exposure in Mexico City. *Env Health Perspect* 1994;102: 384-9.
- Rothenberg SJ, Pérez GIA, Perroni-Hernández, Shnas-Arrieta L, Casino-Ortiz, Suro-Carcáno, et al. Fuentes de Plomo en embarazadas de la cuenca de México. *Sal Púb de Méx*, 1990;32:632-43.
- Hernández M, Romiew I, Ríos C, Rivero A, Palazuelos. Lead glazed ceramics as major determinants of blood lead levels in mexicans women. *Environ Health Persp* 1991;94:117-20.
- Farias P, Borja-Aburto VH, Ríos C, Hertz-Picciottoll, Rojas-Lopez M, Chavez-Ayala R. Blood lead levels in pregnant women of high and low socio-economic status in Mexico City. *Environ Health Persp* 1996;104:1070-4.
- WHO. Revisión de the WHO guidelines for drinking-water quality. *Report of the final task group meeting*. Ginebra: World Health Organization, 1992.
- Klaassen CD. Metales pesados y sus antagonistas. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9ª. edición. Editada por Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW y Goodman-Gillman AG. McGraw-Hill Interamericana, 1996.
- Conrad M, Barton J. Factors affecting the absorption and excretion of lead in the rat. *Gastroenter* 1978;74:731-40.
- Schweinsberg F, Ven Karsa L. Heavy metal concentrations in humans. *Comp Biochem Physiol* 1990; 95:117-20.
- Chilson JJ. The continuing hazard of lead exposure and its effects in children. *Neurotoxicol* 1984; 5:23-42.
- Goyer RA. Toxic effects of metals. In: Cassarett and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 3rd. ed. Macmillan Publishing Co. New York, 1985.
- Cassarett and Doull's. *Toxicology the basic science of poisons*. 4ª Ed. ed. Mc Graw-Hill, INC, 1991.
- Task. Accumulation of toxic metals with specific reference to their absorption excretion, and biological half-times. *Environ Physiol Biochem* 1973; 3:65-107

24. Barton J, Conrad S, Harrison L. Effects of iron on the absorption and retention of lead. *J Lab Clin Med* 1978; 92:537-47.
25. Kaplan ML, Jones AG, Davis MA, Kopito L. *Life Sci* 1973;16:1545-54.
26. Rabinowitz MB, Wetherill GW, Kopple JD. Studies of human lead metabolism by use of stable isotope tracers. *Env Health Perspect* 1974;145:13.
27. Chang LW, Wade PR. Prenatal and neonatal toxicology and pathology of heavy metals. *Advan Pharmacol Chemot* 1980;17:195-231.
28. Antonio MT, Copras I, Leret ML. Neurochemical change in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicol Letters* 1999;104:1-9.
29. Breadbury MWM, Deane R. Permeability of the blood-brain barrier to lead. *Neurotoxicol* 1993;14:131-6.
30. Douglas CA, Doyle GG. In: Cassarett and Doull's. *Toxicology the basic science of poisons*. 4^a Ed. ed. Mc Graw-Hill, INC, 1991.
31. Franklin CA, Inskip MJ, Bacchanale CL, Edwards CM, Manton WI, Edwards E *et al*. Use of sequentially administered stable lead isotopes to investigate changes in blood lead during pregnancy in a nonhuman primate (macaca fascicular). *Fundamen Appl Toxicol* 1997;39:109-19.
32. Bressler J, Goldstein WG. Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 479-84.
33. Bressler J, Kyung-ah Kim, Tamal Ch, Goldstein G. Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochem Res* 1999;24:595-600.
34. Sündström R, Mützing K, Kalimo H, Sourander P. Changes in the integrity of the blood-brain barrier in suckling rats with low dose lead encephalopathy. *Act Neuropathol* 1985;68:1-9.
35. Goyer RA. Toxic effects of metal. In: *Toxicology: The basic science of poisons*. Eds. M O Admur, J. Doull and C D Laassen. Ed. Mc. Gaw Hill 4Th ed. New York, 1993.
36. Singh C, Saxena DK, Murthy RC, Candra SV. Embryo-fetal development influenced by lead exposure in iron-deficient rats. *Human Exp Toxicol* 1993; 12:25-8.
37. Hamilton JD, O'Flaherty EJ. Effects of lead on skeletal development in rats. *Fund Appl Toxicol* 1994;22:594-604.
38. Davis K. *The molecular biology of aging*. Liss RA, ed. New York, 1990.
39. Claudio L, Lee T, Wolff MS, Wetmur JG. A murine model of genetic susceptibility to lead bioaccumulation. *Fund Appl Toxicol* 1997;35:84-90.
40. Bellinger D, Leviton A, Waternaux C, Needleman H, Rabinowitz M. Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *N Engl J Med* 1987;316:1037-43.
41. Lasley S, Gilbert ME. Glutamatergic components underlying lead-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity. *Neurotoxicol* 2000; 21:1057-68.
42. Needleman H, Gune C, Leviton A, Reed R, Peresie H, Maher C, *et al*. Defects in psychology and classroom performance in children with elevated dentine lead levels. *N Engl J Med* 1979;300:689-95.
43. Patrick GW, Anderson WJ. Dendritic alterations of cerebellar Purkinje Neurons in postnatally lead-exposed kittens. *Develop Neurosci* 2000;22:320-8.
44. Cory-Slechta DA. Relationships between lead-induced learning impairments and changes in dopaminergic cholinergic and glutamatergic neurotransmitter systems functions. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:391-415.
45. Watt GCM, Britton A, Gilmour HG, Moore GD, Murray GD, Robertson SJ. Public health implications of new guidelines for lead in drinking water: a case study in an area with historically high water lead levels. *Food, Chemical Toxicol* 2000;38:573-9.
46. Cohn J, Cory-Slechta DA. Subsensitivity of lead-exposed rats to the accuracy-impairing and rate-altering effects of MK-801 on a multiple schedule of repeated learning and performance. *Brain Res* 1993;600:208-18.
47. Rice DC. Lead-induced changes in learning: Evidence for behavioral mechanisms from experimental animal studies. *Neurotoxicol* 1993;14:167-78.
48. Needleman HL, Gatsonis CA. Low-level exposure and the IQ of children. *JAMA* 1990;263:673-8.
49. Bellinger D, Sloman J, Leviton A, Rabinowitz M, Needleman HL, Waternaux C. Low-Level lead exposure and children's cognitive function in the preschool years. *Pediatrics* 1992; 87:219-27.
50. Gilbert SG, Rice DC. Low-level lifetime lead exposure produces behavioral toxicity (spatial discrimination reversal) in adults monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987;91:484-90.
51. Rice DC, Karpinski KF. Lifetime low-level lead exposure produces deficits in delayed alternation in adults monkeys. *Neurotoxicol Teratol* 1988;10:207-14.
52. Laughlin NK, Bowman RE, Levin DE, Bushnell PJ. Neurobehavioral consequences of early exposure to lead in rhesus monkeys: effects on cognitive behaviors. In: Clarkson T, ed. Reproductive and developmental toxicity of metals. New York: Plenum Press, 1983.
53. Cory-Slechta DA, Weiss B, Cox C. Performance and exposure indices of rats exposed to low concentrations of lead. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;78:291-99.
54. Molfese DL, Laughlin NK, Morse PA, Linnville S.E, Wetzel WF, Erwin RJ. Neuroelectrical correlates of categorical perception for place of articulation in normal and lead tested rhesus monkeys. *J Clin Exp Neuropsychol* 1986;8:680-96.
55. Morse PA, Molfese D, Laughlin NK, Linnville SE, Wetzel WF. Categorical perception for voicing contrast in normal and lead treated rhesus monkeys: electrophysiological indices. *Brain Lang* 1987;30:63-80.
56. Gilbert ME, Mack CM. Chronic developmental lead exposure accelerates decay of long-term potentiation in rat dentate gyrus *in vivo*. *Brain Res* 1998; 789:139-49.
57. Gilbert ME, Mack CM, Lasley SM. The influence of development period of lead exposure on long-term potentiation in the adult rat dentate gyrus *in vivo*. *Neurotoxicol*, 1999; 20:57-70.
58. Levin ED, Bowman RE, Wegert S, Vuchetich J. Psychopharmacological investigations of a lead-induced long-term cognitive deficit in Monkeys. *Psychopharmacol* 1987;91:334-41.
59. Corey-Slechta DA, Pokora MJ, Widsowski DV. Behavioral manifestations of prolonged lead exposure initiated at different stages of the life cycle: II Delayed spatial alternation. *Neurotoxicol* 1991;12:761-76.
60. Lasley SM, Gilbert ME. Presynaptic glutamatergic function in dentate gyrus *in vivo* is diminished by chronic exposure to inorganic lead. *Brain Res* 1996;736:125-34.
61. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica 1996;13:1-20.
62. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica 1995;12:1-20.
63. Albert LA, Martínez-Dewane MG, García-Mateos MR. Metales pesados I. Plomo en el cabello de niños mexicanos. *Rev Soc Quím Méx* 1986;30:55-62.
64. Hernández AM, Palazuelos RE. Intoxicación por plomo en México: Prevención y Control. *Instituto Nacional de Salud Pública* 1994;21:57-75.
65. SEMARNAP. *Programa de trabajo*. Cap. IC, 1999
66. Diario Oficial de la Federación. Junio 25, 1999.