



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1266/ C. C.BIOLOGÍA

C. Nancy Elizabeth Franco Rodriguez

PRESENTE

Manifiestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes**, opción **Tesis**: con el título: **"Neurotoxicidad inducida por la exposición perinatal de acetato de plomo"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo, le informamos que ha sido aceptado como Director el Dr. **Juan Reyes Gómez** y como asesor la Dra. **Martha Catalina Rivera Cervantes**.

Sin más por el momento, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan., 09 de enero de 2008.

DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

G.A.

En C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dr. Fco. Martín Huerta Martínez,
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **Tesis o informes**, opción **Tesis** con el título: "**Neurotoxicidad inducida por la exposición perinatal de acetato de plomo**" que realizó la pasante **Nancy Elizabeth Franco Rodríguez** con número de código 394332818, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

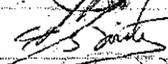
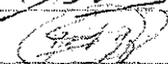
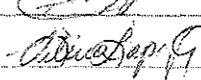
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, Jal., 10 de enero de 2008.


 Dr. Juan Reyes Gómez
 Director


 Dra. Martha C. Rivera Cervantes
 Asesor

Vo Bo


Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobación	Fecha de aprobación
Dr. Alfredo Ignacio Feria Velasco		10 Enero 2008
Dr. Carlos Beas Zárate		10 Enero 2008
Dr. Ramón Reynoso Orozco		10 Ene 2008
Supl. Dra. Silvia Josefina Pérez López		10 Ene 2008

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Juan Reyes Gómez y Martha Catalina Rivera Cervantes y por su invaluable apoyo para la consecución de este trabajo. A ellos mi más sincero agradecimiento.

A mis compañeros, Erika y Alejandro y demás integrantes del laboratorio de Neurobiología celular que de una u otra forma colaboraron en este trabajo.

A mi Madre, Elvira Rodríguez Ramírez por el apoyo y confianza que me ha brindado.

A mis amigas y compañeras de laboratorio Irene Aguilar García y Yanet Gutiérrez Mercado, por sus consejos e invaluable sugerencias.

A la Universidad de Guadalajara por su apoyo en mi formación profesional.

A mi padre

Jesús Franco P.

Mi primer maestro

A mi madre

Elvira Rodríguez R.

Por su amor y por su apoyo

A mis hermanos

Leslie, Jesús y Argelia

Por su amor y compañerismo

RESUMEN

El efecto tóxico del plomo (Pb^{2+}) es conocido, su utilización en la fabricación de pinturas, vitrificados de cerámica, como aditivo en gasolina y más, resulta en la adición al suelo, alimentos y suministros de agua. El SNC es el blanco primario y durante el desarrollo del SN es vulnerable a la neurotoxicidad por Pb^{2+} . Los mecanismos fundamentales de toxicidad por Pb^{2+} se relacionan con la sustitución de este sobre el ion calcio en la maquinaria celular. Las acciones neurotóxicas del Pb^{2+} incluyen apoptosis, excitotoxicidad, disturbios en almacenamiento y liberación de neurotransmisores e interferencia en señales de segundos mensajeros. Estudios clínicos muestran que niveles de Pb^{2+} en sangre de $10\mu\text{g/dL}$ causa déficit cognitivo. El objetivo principal de este trabajo fue la utilización de un modelo *in vivo* en rata de la cepa Wistar, en la evaluación de la neurotoxicidad inducida por la exposición perinatal a acetato de Pb^{2+} , en hipocampo de rata, evaluando los niveles de Pb^{2+} en sangre y la viabilidad celular en hipocampo. Estos experimentos se diseñaron con el objetivo de caracterizar un modelo de intoxicación crónica por la exposición de acetato de Pb^{2+} *in vivo*. El análisis de espectrofotometría de absorción atómica, demostró un incremento de la concentración de Pb^{2+} en sangre tras la exposición a acetato de Pb^{2+} en la etapa perinatal. En el análisis de viabilidad celular se observó aumento en el número de células no viables en el hipocampo, mostrando mayor susceptibilidad en el día 4 de EP. En conclusión el aumento en la concentración de Pb^{2+} en sangre causa baja en la viabilidad en células de hipocampo con un efecto dosis y edad dependiente.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	11
Modelos de neurotoxicidad por Pb^{2+} <i>in vitro</i>	11
Modelos de neurotoxicidad por Pb^{2+} <i>in vivo</i>	13
Estudios clínicos	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	20
DIAGRAMA EXPERIMENTAL	21
METODOLOGÍA	22
Reactivos utilizados	22
Material biológico y tratamientos	22
Protocolo de exposición a Pb^{2+}	23
Análisis de Pb^{2+} en sangre	23
1. Toma de muestras	23
2. Limpieza del material	24
3. Procedimiento de análisis	24
4. Preparación de la muestra	24
5. Preparación de patrones y curva de calibración	25
6. Determinación espectrofotométrica	25
7. Cálculos	26
Evaluación de viabilidad celular	26
Evaluación de peso corporal	27
RESULTADOS	28
Determinación de los niveles de Pb^{2+} en sangre	28
Evaluación de peso corporal	30
Análisis de la viabilidad celular	31
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	36
APÉNDICES	37
Apéndice 1 (Soluciones de acetato de Pb^{2+})	37
Apéndice 2 (Técnica de punción cardiaca)	38
Apéndice 3 (Reactivos para determinación de Pb^{2+} en sangre)	39

1)	Disolución tritón X-100/APDC	39
2)	Isobutilmetilcetona saturada con agua	39
3)	Disolución patrón de Pb^{2+} de 1000 mg/mL	39
4)	Disoluciones de trabajo	39
Apéndice 4 (Reactivos para viabilidad celular)		40
1)	PBS 0.310 Osm, pH 7.2	40
2)	Hank's y Hank's con Ca^{2+} y Mg^{2+} pH 7.4	40
3)	DNAasa I	40
4)	Tripsina	41
5)	Inhibidor de tripsina	41
6)	Yoduro de propidio	41
7)	Diacetato de Fluoresceína	41
BIBLIOGRAFÍA		42

ABREVIATURAS

AMPc	<i>Monofosfato de adenosina cíclico</i>
APDC	<i>Pirrolidinditiocarbamato de amonio</i>
AP-1	<i>Activador proteína-1</i>
Bcl-Xs	<i>Proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2</i>
BDNF	<i>Factor neurotrófico derivado del cerebro</i>
°C	<i>Grados centígrados</i>
Ca²⁺	<i>Ión calcio</i>
CI	<i>Coefficiente intelectual</i>
cols.	<i>Colaboradores</i>
CREB	<i>Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc</i>
DAF	<i>Diacetato de fluoresceína</i>
dL	<i>Decilitros</i>
DNAasa	<i>Desoxiribonucleasa I recombinante de bovino</i>
EC₅₀	<i>Concentración efectiva media o 50</i>
EP	<i>Edad posnatal</i>
EPA	<i>Agencia de protección ambiental</i>
°F	<i>Grados Fahrenheit</i>
g	<i>Gramos</i>
GFAP	<i>Proteína Ácida Fibrilar Glial</i>
h	<i>Horas</i>
IC₅₀	<i>Concentración inhibitoria media</i>
IP	<i>Yoduro de propidio</i>
JNK	<i>Proteína cinasa c-jun N-términal</i>
µM	<i>Micromolar</i>
µg	<i>Microgramos</i>
µL	<i>Microlitros</i>
MAPKK	<i>Proteína Activada por Mitógeno Doble Cinasa</i>
MIBK	<i>Isobutilmetilcetona</i>
Mg²⁺	<i>Ión magnésio</i>

mL	<i>Mililitros</i>
mm	<i>Milímetros</i>
mOsm	<i>Miliosmoles</i>
NF-κB	<i>Factor nuclear kappa B</i>
NIOSH	<i>National Institute of Occupational Safety and Health</i>
nm	<i>Nanómetros</i>
NMDA	<i>N-Metil D-Aspartato</i>
NO	<i>Óxido nítrico</i>
NOS	<i>Sintasa de óxido nítrico</i>
Pb²⁺	<i>Ión plomo</i>
Pb²⁺S	<i>Ión plomo en sangre</i>
PBS	<i>Amortiguador de fosfatos</i>
PC12	<i>Línea celular derivada de feocromocitoma de rata</i>
PKC	<i>Proteína Cinasa C</i>
ppm	<i>Partes por millón</i>
PVC	<i>Policloruro de vinilo</i>
RNA_m	<i>Acido ribonucleico mensajero</i>
ROS	<i>Especies Reactivas de Oxígeno</i>
SOD	<i>Superóxido Dismutasa</i>
SN	<i>Sistema Nervioso</i>
SNC	<i>Sistema Nervioso Central</i>
SNP	<i>Sistema Nervioso Periférico</i>
Tritón X-100	<i>Octil-fenoxi-polietoxietanol</i>
U	<i>Unidades</i>
V/V	<i>Volumen sobre volumen</i>

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso (SN) es un conjunto de estructuras especializadas a través de las cuales un organismo obtiene información sensorial del ambiente, evalúa la importancia de la información, y genera respuestas de conducta apropiadas. Desde el punto de vista anatómico se divide en dos componentes: el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico.

El SNC está formado por el cerebro y la médula espinal. El cerebro se encuentra en la cavidad craneal y está protegido por las meninges y se divide en tres componentes principales que son: desde la parte caudal a la cervical el cerebro posterior (también llamado rombencéfalo), el cerebro medio (el mesencéfalo) y el cerebro anterior (el prosencéfalo).

Para evaluar la información, tomar decisiones y reaccionar de forma adecuada ante las percepciones del mundo exterior, es necesario que el sistema nervioso funcione de manera coordinada y no resulte afectado por situaciones de daño, como: trauma o la exposición a niveles peligrosos de productos químicos neurotóxicos. De igual forma las lesiones del sistema nervioso pueden provocar diversas alteraciones en la función sensorial (pérdida de visión, audición, olfato, etc.) y motora, en la fisiología general del organismo, el almacén de información; además, puede originar trastornos del comportamiento o psicológicos (Kandel y cols., 2000).

La neurotoxicidad puede ser definida como la capacidad de un agente químico, biológico o físico de inducir efectos adversos en el sistema nervioso, se considera que un agente es neurotóxico cuando es capaz de inducir un patrón constante de disfunción neural o cambios en la química o la estructura del sistema nervioso (Simonsen y cols., 1994). Estos efectos dependen de la naturaleza del producto químico, de la dosis, del tiempo de exposición, de las características y del entorno del individuo expuesto (Burger y cols., 2003).

Las sustancias neurotóxicas comprenden: compuestos orgánicos volátiles, compuestos orgánicos solubles, sólidos suspendidos, pesticidas, colorantes, compuestos nitrogenados, metales pesados, etc. Por regla general, la toxicidad de

los metales aumenta con el peso atómico, dentro de los que se consideran como los más tóxicos están el plomo y el mercurio entre otros.

El plomo es un metal pesado, de baja temperatura de fusión, de color gris-azulado que se encuentra como mineral en la corteza terrestre. Sin embargo, raramente se encuentra en la naturaleza en forma de metal. Generalmente se encuentra combinado con dos o más elementos formando compuestos de plomo. Las fuentes de liberación del plomo hacia el ambiente, incluyen la liberación por procesos naturales, como son la actividad volcánica, erosión y bioacumulación; actividades antropogénicas intencionales, como la minería, metalurgia y uso industrial; procesos antropogénicos no intencionales, como la incineración y quema de combustibles fósiles (Caussy y cols., 2003). La presencia del plomo, a partir de sus fuentes de contaminación, lo convierte al plomo en un metal de alto riesgo tóxico constituyendo un problema de salud pública, causando efectos tóxicos que incluyen anemia, disfunciones neurológicas, pudiendo llegar a encefalopatías mortales. Los efectos tóxicos del plomo presente en el ambiente dependen en gran medida de: la biodisponibilidad, vía de administración, dosis, tiempo de exposición y de la estructura química del compuesto, el plomo se presenta tanto en compuestos químicos inorgánicos como orgánicos en estados de oxidación dos y cuatro comúnmente.

El plomo posee una química catiónica bien definida, la mayor parte de sus sales son poco solubles o insolubles en agua. Sin embargo, el catión divalente Pb^{2+} una vez que se absorbe, forma complejos con ligandos biológicos, preferentemente con moléculas que presentan sitios de unión a cationes metálicos; las especies inorgánicas son habitualmente liposolubles y fácilmente absorbibles. En la tabla I se muestran algunos compuestos de plomo de uso común, por ejemplo, el policloruro de vinilo (PVC) usualmente contiene componentes de plomo como estabilizantes, el sulfato de plomo tribásico ($3PbO.PbSO.HO$) en combinación con plastificantes por ejemplo los ftalatos, que al exponerse a los rayos ultravioletas, se forman polvos de sulfato de plomo que puede ser fácilmente ingerido por los niños, debido al hábito de llevarse a la boca los objetos (Brouwer, 2005).

Tabla 1. Algunos compuestos de plomo y sus usos más comunes.

	COMPUESTO	USOS
INORGÁNICOS	Plomo metal	Solo es tóxico cuando alcanza temperaturas próximas a 500°C por la emisión de vapores.
	Minio	Oxido de plomo rojo, base de pinturas anticorrosivas
	Bióxido de plomo	Utilizado como colorante amarillo
	Cromato de plomo	Utilizado como colorante amarillo
	Arseniato de plomo	Componente de insecticidas
	Sulfuro de plomo	También llamado galena, empleado en alfarería.
ORGÁNICOS	Acetato de plomo	Muy soluble, por lo que se absorbe fácilmente por vía digestiva, empleado como abortivo.
	Tetraetilo de plomo	Aditivo en gasolinas para aumentar su rendimiento.
	Naftenato de plomo	Componente de grasas y aceites de uso industrial.
	Sulfato de plomo	Utilizado como estabilizante en el PVC.
	Estereato de plomo	Utilizado como estabilizante en plásticos.

Algunos compuestos de plomo se usan como pigmentos en pinturas, en barnices para cerámica y en materiales de relleno. El tetraetilo de plomo y tetrametilo de plomo se usaron como aditivos para aumentar el octanaje de la gasolina hasta el año de 1989, cuando la EPA prohibió el uso de gasolina con plomo para transporte por carretera (Klaassen y cols., 1999).

La biodisponibilidad se entiende como la relación que existe entre la sustancia tóxica, en este caso el plomo, y el efecto tóxico que ejerce sobre el organismo huésped. La biodisponibilidad depende de las características del huésped, como son la captación, absorción, biocinética y susceptibilidad al metal. Además, la

susceptibilidad es influenciada por algunos factores; por ejemplo: la edad, género, peso, condición nutricional y genética (Burger y cols., 2003).

La intoxicación puede realizarse por diferentes fuentes de exposición, estas dependen del medio contaminado, aire, suelo, agua, o alimentos, etc. Por ejemplo, para los niños algunas vías de exposición son más susceptibles que otras, como la ingestión de polvo conteniendo compuestos con plomo, por otro lado existen poblaciones particulares que se ven expuestas de forma local, como la gente que consume vegetales contaminados o en zonas habitacionales alrededor de fundidoras de plomo (Calderón y cols., 2003; Caussy y cols., 2003).

Desde cualquiera de las fuentes contaminantes, el plomo puede ingresar en el organismo por tres vías de exposición: la digestiva, respiratoria y dérmica.

La vía más frecuente de intoxicación es la digestiva, la absorción gastrointestinal de Pb^{2+} es del 10% en adultos, mientras en niños puede alcanzar hasta el 50% (Burger y cols., 2003). La ingestión de plomo a través del tracto gastrointestinal puede ser mediante el consumo de alimentos conteniendo plomo, por ejemplo, alimentos ácidos cocinados en cazuelas de barro vitrificadas con plomo, frutas y verduras contaminadas con pesticidas con plomo, alimentos enlatados que fueron elaborados o almacenados en recipientes con soldadura de plomo o vinos destilados por utensilios con aleaciones de plomo, pescados y moluscos provenientes de ríos o lagos contaminados, además la pintura puede ser otra fuente de intoxicación en niños debido a su hábito de llevarse a la boca los objetos a su alcance, se encuentran altas concentraciones de plomo en juguetes, lápices, empaques de dulces, etc. La vía dérmica es rara y ocurre sólo en casos de exposición industrial, sin embargo se han reportado su incorporación mediante cosméticos y tintes para cabello (Romieu, 2003; Waldron, 1979).

Una vez que el plomo se absorbe a través de cualquiera de las tres vías antes mencionadas, cierta fracción pasa al torrente sanguíneo y el resto se elimina, ya sea por exhalación, por el tracto gastrointestinal en las heces o en la orina (Caussy y cols., 2003). La fracción de plomo incorporada al organismo depende de la

capacidad intrínseca de absorción del órgano, así como de las características del individuo.

En la etapa de gestación, neonatal e infancia, algunos factores como: los rápidos cambios en la estructura y función de muchos órganos, y la inmadurez de la barrera hematoencefálica durante el primer año de vida; influyen en la susceptibilidad a los efectos tóxicos del plomo, en estas etapas del desarrollo (Burger y cols., 2003). La deficiencia de calcio y otros metales como el hierro, afectan la absorción al existir una mayor captación de metales a nivel gastrointestinal y la consecuente acumulación del plomo en tejidos y huesos debido a la deficiencia de Ca^{2+} (Mason, 2000).

El Pb^{2+} que se absorbe se distribuye en el organismo a través de la sangre, donde tiene una vida media de 30 días, así el Pb^{2+} se incorpora a los tejidos siguiendo la distribución del Ca^{2+} y otros iones metálicos (Gerson, 1990). En tejidos blandos tiene una vida media de 40 días, mientras que en hueso se puede almacenar por décadas, aunque en condiciones de descalcificación o acidosis es liberado fácilmente hacia la sangre. Por ejemplo, durante el embarazo, lactancia o menopausia, el Pb^{2+} se libera de depósitos almacenados en hueso proveniente de exposiciones anteriores, de esta forma se elevan los niveles sistémicos de Pb^{2+} después de la exposición inicial (Berglund y cols., 2000).

En relación al tiempo de exposición, la intoxicación por Pb^{2+} puede ser aguda o crónica, la exposición aguda se produce por ingestión de sales solubles o inhalación de vapores o polvos, generalmente de forma accidental y en dosis mayores a 40 $\mu\text{g}/\text{dL}$ de Pb^{2+} ; cuando los individuos son expuestos de forma aguda a este ión metálico, se presentan síntomas como: cólico, vómito, diarrea y cefaleas; en niveles de Pb^{2+} en sangre alrededor de 350 $\mu\text{g}/\text{dL}$ puede causar convulsiones, coma y hasta la muerte; en algunos casos se presentan secuelas como epilepsia, retraso mental y ceguera. En la figura 1 se muestran algunas alteraciones patológicas observadas con niños en relación a los niveles de Pb^{2+} en sangre.

ALTERACIONES PATOLÓGICAS

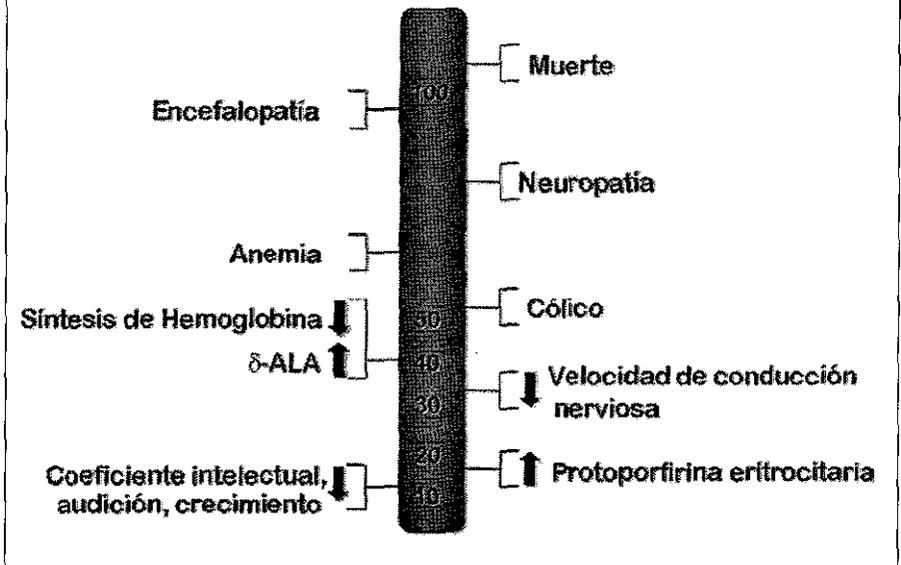


Figura 1. La gráfica muestra las alteraciones patológicas de acuerdo a la concentración de Pb^{2+} en sangre en niños expresada en $\mu g Pb^{2+}/dL$. Modificado de Garza y cols. (2005)

En una exposición crónica, el individuo se ve expuesto por periodos de tiempo prolongados y generalmente en dosis menores a $40 \mu g/dL$ de Pb^{2+} ; los individuos expuestos presentan alteraciones cognitivas, motoras y conductuales (Klaassen y cols., 1999).

El Pb^{2+} se distribuye en todos los tejidos del organismo, aún a bajas concentraciones, una de las partes más vulnerables del organismo es el SNC, particularmente en las etapas tempranas del desarrollo; algunos factores que influyen son la alta absorción gastrointestinal y disminución de la excreción (Lidsky y cols., 2003), la inmadurez de la barrera hematoencefálica, la intensa diferenciación y

proliferación celular, además de que el proceso de sinaptogénesis tiene lugar durante la gestación y etapa neonatal (Antonio y cols., 2003).

En exposición a Pb^{2+} , con niveles en sangre alrededor de 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$, algunas regiones del SNC como el hipocampo presentan mayor daño, trabajos experimentales han reportado deterioro en procesos de aprendizaje y memoria, esto sugiere su acción tóxica sobre hipocampo, ya que éste tiene una función esencial en estos procesos (Cohn y cols., 1994; Gilbert y cols., 1996; Kuhlmann y cols., 1997; Wei y cols., 2006; García y cols., 2004).

El mecanismo de intoxicación celular propuesto para el Pb^{2+} se debe a la sustitución de este ión por Ca^{2+} , debido a la mayor afinidad del primero sobre diversos sustratos del Ca^{2+} , alterando de esta forma la fisiología celular (Pounds, 1984; Simons, 1993), en la figura 2 se muestran algunas posibles acciones tóxicas en la neurona. Entre algunos de los sistemas de segundos mensajeros que se ven afectados son la calmodulina y la PKC, ambas proteínas involucradas en forma importante con la señalización intracelular; además alterando la actividad los distintos canales y transportadores catiónicos, por ejemplo bloqueando canales de Ca^{2+} activados por voltaje y receptores N-Metil D-Aspartato (NMDA). Además, posee otros efectos citotóxicos relacionados con la inhibición de enzimas antioxidantes, como Superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión reductasa (Zhang y cols., 2004; García y cols., 2004), lo que trae como consecuencia el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), que a su vez desencadena la activación proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, causando la apertura del poro de transición mitocondrial y la consecuente liberación del citocromo C, activando caspasas, esto resulta en muerte celular apoptótica. Algunas de las acciones neurotóxicas del Pb^{2+} incluyen: alteración en la actividad de neurotransmisores, interferencia en la actividad de segundos mensajeros, peroxidación de lípidos, estrés oxidativo, alteraciones en la regulación de la transcripción de genes específicos, estos eventos se han asociado a daño celular excitotóxico y apoptosis (Bressler y cols., 1991).

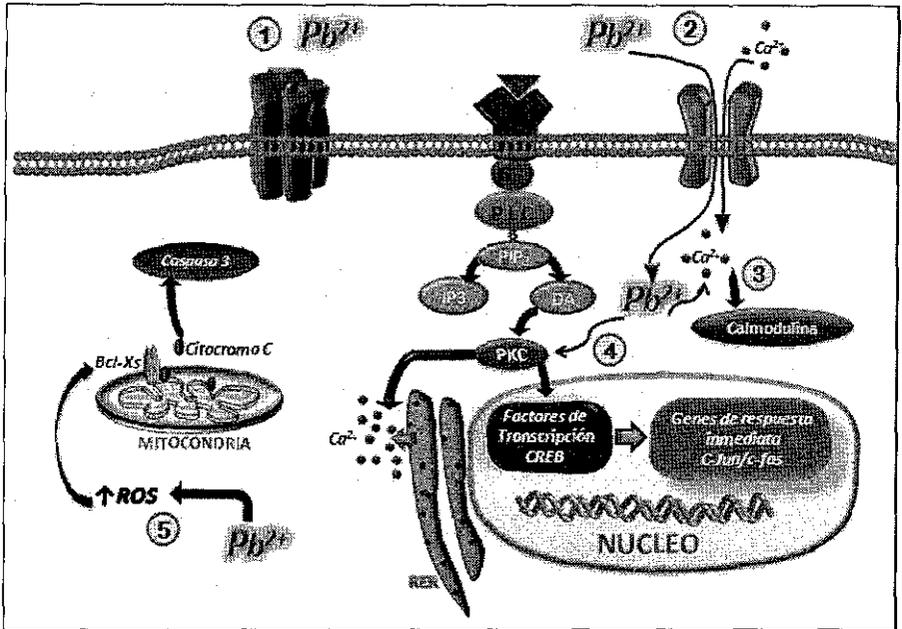


Figura 2. Posibles acciones tóxicas del Pb^{2+} en la neurona. (1) Bloqueando receptores NMDA y como antagonista no competitivo en el sitio de unión a glicina. (2) Bloqueando canales dependientes de voltaje. (3) Activando calmodulina. (4) Activando PKC. (5) Aumentando ROS.

ANTECEDENTES

Los mecanismos de toxicidad de Pb^{2+} no se han establecido aún, razón por la cuál se sigue trabajando en ello (Lidsky y cols., 2003). Una de las teorías establece que el Pb^{2+} puede afectar el metabolismo del Ca^{2+} , por ejemplo, bloqueando canales dependientes de voltaje y NMDA (Busselberg y cols., 1994, Bernal y cols., 1997), de esta forma el Pb^{2+} mimetiza la acción de Ca^{2+} a nivel celular, interrumpiendo la homeostasis de Ca^{2+} intracelular (Pounds, 1984; Simons, 1993). Dado que el Ca^{2+} actúa como mediador intracelular cumpliendo una función de segundo mensajero en muchos procesos celulares involucrados en señales de transducción, el sustituir el Pb^{2+} por Ca^{2+} trae como consecuencia que vías de señalización celular se afecten (Costa, 1998) por ejemplo, la estimulación de la actividad de la PKC y la consecuente inducción de factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1) (Ramesh y cols., 2001).

Para estudiar los mecanismos implicados en la neurotoxicidad por Pb^{2+} se han diseñado diversos modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*, esto con la finalidad de evaluar el efecto tóxico en los organismos debido a la exposición a Pb^{2+} , y la susceptibilidad a Pb^{2+} en la etapa de desarrollo del SNC.

MODELOS DE NEUROTOXICIDAD POR Pb^{2+} *IN VITRO*

En general los estudios *in vitro* se realizan en cultivos de células cerebrales, ya sean de líneas celulares establecidas o de cultivos llevados a cabo a partir de células cerebrales de la región de interés, se cultivan las células en un medio de crecimiento específico y por un tiempo determinado. La exposición al daño tóxico es inducido en un medio diferente al del crecimiento celular, y se mantiene a las células por un periodo posdaño, que precede a la evaluación de la sobrevivencia neuronal. Las condiciones de cultivo, así como el tiempo durante el cual se mantienen las células en cultivo influyen en el daño neuronal resultante, pudiendo modificar la vulnerabilidad a la aplicación del Pb^{2+} . La exposición a plomo puede ser sistémica, administrada al animal o de forma directa en el cultivo.

Oberto y cols. (1996) efectuaron un estudio en neuronas de la granulosa cerebelar de ratas neonatas en el que se observó una rápida captación de Pb^{2+} , promoviendo apoptosis con EC_{50} a una concentración de $10 \mu M$ de Pb^{2+} , por otro lado Mazzolini y cols. (2001) realizaron un estudio en cultivos de células de la granulosa cerebelar de 8 días de edad posnatal (EP) de rata, en el que se demostró que el Pb^{2+} puede permear la membrana de la neurona a través de sistemas de transportadores específicos y acumularse en el interior de la célula. La mayor captura de Pb^{2+} , en este tipo de neuronas, fue a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, en competencia con el Ca^{2+} . Además, se observó que el Pb^{2+} cruza la membrana a través de receptores NMDA y canales de Ca^{2+} tipo-L.

Estudios realizados en cultivos de neuronas de hipotálamo GT1-7, de ratón expuestas a acetato de plomo en concentraciones de 1, 10 y $100 \mu M$ de Pb^{2+} , por 12, 24, 48 ó 72 h, produjeron muerte neuronal, que inició con baja en la viabilidad celular a las 24 h con un rango de 10 a 20% y terminó con una baja del 20 a 40% en la viabilidad celular a las 72 h (Loikkanen y cols., 2003). Otros estudios efectuados en cultivos corticales de cerebros embrionarios de 14 días expuestos a soluciones de acetato de Pb^{2+} en diferentes concentraciones: 1, 3, 10, 30, $100 \mu M$ Pb^{2+} . Los resultados en las neuronas tratadas con la concentración de $100 \mu M$ Pb^{2+} presentaron un rápido decremento del 60% en el número de neuronas viables, a partir del día 1 con respecto al control. En contraste, en los cultivos expuestos a las concentraciones de 1 y $3 \mu M$ Pb^{2+} hubo un incremento de 10 veces en el número de neuronas con respecto al control en el día 4 (Davidovics y cols., 2005).

Cultivos cerebelares de astrocitos (Raunio y cols., 2001) mostraron una mayor captación de Pb^{2+} que de Ca^{2+} al estar estos en competencia, evaluado mediante espectrometría de absorción atómica. Por otro lado, estudios realizados con células corticales en las que se evaluó la actividad de calmodulina, dependiente de Ca^{2+} , mostró que el Pb^{2+} es capaz de activarla a concentraciones menores y alcanzar su máxima activación a una concentración de $30 \mu M$, mientras que con Ca^{2+} la mayor actividad se da a $50 \mu M$ (Sandhir y cols., 1994). Estos resultado sugieren que el Pb^{2+} es capaz de desplazar y mimetizar la acción de Ca^{2+} , afectando la homeostasis del Ca^{2+} intracelular libre, lo que conlleva a la activación de la proteína cinasa

dependiente de Ca^{2+} /calmodulina y a la posterior fosforilación de proteínas específicas, como la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB).

Jadhav y cols., (2000) han mostrado en células PC12, que el Pb^{2+} induce muerte celular, mediante el aumento de ROS mediadas por glutamato, teniendo una función muy importante la PKC y el Ca^{2+} intracelular; otros estudios realizados por Xu y cols. (2006), en células PC12 mostraron que el Pb^{2+} induce apoptosis, además del incremento de la expresión de la proteínas Bax y caspasa 3, ambas proteínas pro-apoptóticas. Estos estudios indican que el plomo induce muerte celular en sistema nervioso en células en cultivo, así como los diferentes blancos celulares.

Sin embargo, las condiciones del cerebro en desarrollo conduce a continuar con estudios experimentales *in vivo*, con el fin de establecer y evaluar los daños en el SNC, que se produzcan durante la exposición a Pb^{2+} . Además, la respuesta del organismo a la presencia del Pb^{2+} es muy variable, depende de la concentración y período de exposición, así como de la ruta de contacto.

MODELOS DE NEUROTOXICIDAD POR Pb^{2+} *IN VIVO*

En los modelos de neurotoxicidad se ha realizado la intoxicación de forma sistémica a través de la administración de soluciones a partir de sales de Pb^{2+} (por ejemplo acetato de Pb^{2+}), de manera de obtener un cuadro crónico o agudo.

Estudios realizados en ratas de 21 días de EP en un modelo de intoxicación crónica, expuestas durante 90 días a niveles bajos de acetato de Pb^{2+} (50ppm) mostraron un aumento significativo en la acumulación de Pb^{2+} en sangre y tejido cerebral, en regiones como son corteza, estriado, hipocampo, tallo cerebral y cerebelo. En este sentido también se mostró que la presencia del Pb^{2+} puede inducir muerte celular apoptótica, causada por el daño oxidativo a través de la activación de factores de transcripción como: factor nuclear kappa B (NF- κ B), AP-1, proteína cinasa c-jun N-términal (JNK), proteína activada por mitógeno doble cinasa (MAPKK), y caspasas en cerebro (Ramesh y cols., 2001).

Chao y cols. (2007) realizaron un estudio en un modelo de intoxicación crónica en ratas, administrando 0.2% de acetato de Pb^{2+} a las madres gestantes hasta el día 20 de EP de las crías, mostraron elevados niveles de RNAm de caspasa 2, caspasa

3, la proteína Bax, proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2 (Bcl-x) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), tras la exposición a Pb^{2+} , en 12 EP, en el hipocampo, estos efectos no se observaron en otras áreas analizadas, la corteza y el cerebelo; lo anterior sugiere que, tras la exposición a Pb^{2+} , algunas regiones cerebrales como el hipocampo muestran mayor susceptibilidad, además de el incremento en factores que regulan la sobrevivencia celular, tales como Bcl-x y BDNF. El aumento en la expresión de estos factores indican que la célula necesita un balance por las perturbaciones producidas por el Pb^{2+} , que se ven reflejadas en el aumento de factores pro-apoptóticos como caspasa 2, caspasa 3 y Bax. Por otro lado en estudios realizados por Tanaka y cols. (1998) en células de la granulosa cerebelar mostraron que el Pb^{2+} induce apoptosis en el día 9 de EP al evaluar este tipo de muerte por medio de la técnica de inmunohistoquímica.

En otro trabajo con el mismo protocolo de exposición a Pb^{2+} que utilizó Chao y cols. (2007), demostró que el Pb^{2+} reduce el nivel de RNAm para GFAP, lo que conduce a la modificación en la diferenciación y maduración de los astrocitos en el cerebro en desarrollo, esto se vio reflejado en las alteraciones de la arborización neuronal y estructura de los astrocitos (Harry y cols., 1996).

En un modelo de intoxicación con acetato de Pb^{2+} (750ppm), a través de la dieta, en ratas de edad neonatal se observó que el plomo induce un efecto de inhibición indirecto sobre la actividad de receptor NMDA, el cual fue dependiente de la edad del animal y de la región analizada (Guilarte y cols. 1992). Este efecto de inhibición se postula que puede deberse a la alta afinidad del Pb^{2+} por el sitio de unión a cationes presente en el poro del receptor NMDA, conformado por una región con cuatro residuos de glutamato; cuanto mayor es la afinidad del catión por el sitio de unión, más rápida es la entrada al poro del canal y más lenta su salida por el extremo intracelular del mismo, la elevada afinidad del Pb^{2+} hace que su paso por el poro sea más lento que el del Ca^{2+} , de esta forma actúa como bloqueador de canal. Además, la inhibición de los receptores NMDA fue mayor a los 14 días de EP en comparación a lo encontrado en ratas adultas; la concentración media (IC_{50}) necesaria de Pb^{2+} para inhibir el receptor NMDA fue de $34 \pm 4.1 \mu M$ a los 14 días de EP y de $78.1 \pm 6 \mu M$ en las ratas adultas. Mientras que en células de hipocampo la

IC₅₀ de Pb²⁺ fue de 8.7 ± 0.6 µM, lo que sugiere una mayor susceptibilidad al efecto inhibitorio del Pb²⁺. Utilizando un protocolo de exposición a Pb²⁺ muy similar (750 ppm de acetato de Pb²⁺ en la dieta) los niveles de Pb²⁺ en sangre evaluados en este estudio fueron de 13.9 ± 2.8 µg/dL en el grupo expuesto a Pb²⁺ y de 1.16 ± 0.28 µg/dL en los controles; los niveles de Pb²⁺ en sangre de las ratas expuestas a Pb²⁺ son muy similares a los analizados en niños expuestos a Pb²⁺ (Guilarte y cols., 1993).

Sharifi y cols. (2002) realizaron estudios en un modelo de intoxicación aguda, en el que administraron 15 mg de acetato de Pb²⁺ diarios por vía intraperitoneal durante 7 días, a ratas de 2-4 y 12-14 semanas de edad posnatal. Los grupos expuestos a Pb²⁺ mostraron aumento significativo en el nivel de expresión de las proteínas Bax y Bcl-2 siendo más alto en los animales jóvenes. Además, el estudio histológico reveló células con características morfológicas de apoptosis y los niveles de Pb²⁺ en sangre reportados incrementaron cerca de 17-19 veces en relación al control, estos resultados confirman que la neurotoxicidad por Pb²⁺ es un fenómeno dependiente de la edad, mostrando mayor susceptibilidad en la etapa de desarrollo.

Los receptores NMDA juegan un papel importante en los procesos de aprendizaje y memoria (Collingridge y cols., 1990). Los receptores NMDA en el hipocampo son un blanco importante del Pb²⁺ durante la etapa de desarrollo del SN (Lasley y cols., 2001). Zhu y cols., (2005) administraron acetato de Pb²⁺ a ratas en un modelo crónico a diferentes concentraciones: 0.025%, 0.05% y 0.075% en el agua de beber a las madres desde la gestación y hasta el día 21 de EP de las crías (destete), y después las crías recibieron la misma dosis que la madre hasta el día 28 de EP. Se evaluaron los niveles de expresión de RNAm del receptor NMDA en el hipocampo a las edades de 7, 14, 21 y 28 días de EP, encontraron que los niveles de expresión del RNAm para la sub-unidad NR2A se incrementaron significativamente a los días 7 y 14 de EP en los grupos expuestos a la concentración de 0.05% y 0.075% mientras que en el grupo de 0.025% solo fue significativo en el día 7 de EP. Además, en este mismo modelo se observó la inhibición en la actividad de NOS, afectando de esta forma la producción de NO, este último se ve involucrado en la

plasticidad sináptica, en este sentido la intoxicación por Pb^{2+} afecta el proceso de aprendizaje.

Otros estudios mostraron que la exposición a acetato de Pb^{2+} en concentraciones de 750 y 1000 ppm de Pb^{2+} vía oral, durante la etapa de desarrollo, desde la gestación hasta el día 21 EP, causa efectos a largo plazo en el aprendizaje y la memoria en la rata adulta, como déficit en el aprendizaje espacial (Wei y cols., 2006; Kuhlmann y cols., 1997).

ESTUDIOS CLÍNICOS

Estudios realizados en niños han mostrado una fuerte relación entre los niveles de Pb^{2+} en sangre mayores a los 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$, con un bajo desempeño en exámenes de coeficiente intelectual y en otras pruebas sicométricas (Canfield y cols., 2003, Bressler y cols., 1999). Además, estudios experimentales en ratas y monos expuestos a Pb^{2+} después del nacimiento mostraron déficit en aprendizaje aún a niveles bajos de Pb^{2+} en sangre, alrededor de 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (Cory-Selechta, 1995; Rice, 1996).

En una población ubicada dentro de un radio de 1Km con respecto una compañía metalúrgica en donde se procesa Pb^{2+} en Torreón, Coahuila, México, los niños que viven ahí mostraron un incremento en las concentraciones de Pb^{2+} en sangre en un periodo de tres años de 19.2 \pm 4.5 $\mu\text{g}/\text{dL}$ al inicio del estudio y 27.5 \pm 4.9 $\mu\text{g}/\text{dL}$ al final. El daño se reflejó en disminución de la velocidad de conducción neuromuscular, coordinación motora y del coeficiente intelectual (CI) (Calderón y cols., 1996).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los efectos del Pb^{2+} son bien conocidos, sin embargo los mecanismos celulares y moleculares implicados en el daño no son del todo entendidos. Sus efectos tóxicos se han asociado a la capacidad del Pb^{2+} para sustituir a Ca^{2+} alterando su homeostasis y papel en la fisiología de la célula. La exposición crónica a compuestos con Pb^{2+} es altamente neurotóxica particularmente durante el desarrollo del SNC, algunas de las acciones tóxicas del Pb^{2+} incluyen: excitotoxicidad, activación de sistemas de segundos mensajeros, peroxidación de lípidos, estrés oxidativo, disturbios en el almacenaje, producción y liberación de neurotransmisores, activación de la expresión de genes de respuesta inmediata, apoptosis, alteración en procesos de aprendizaje, memoria y bajo coeficiente intelectual. Sin embargo todavía no se conocen las consecuencias que tienen exposiciones a dosis bajas del metal, así como si existe alguna dosis que pueda considerar como segura o tolerada por los organismos; por lo que es importante evaluar los daños que se produzcan en ellos. Además, la respuesta del organismo al Pb^{2+} es muy variable, ya que depende de la dosis y período de exposición, así como de la vía de contacto. Este trabajo pretende establecer el efecto del Pb^{2+} en ratas durante las etapas prenatal y posnatal temprana al ser expuestas a la ingesta de agua conteniendo acetato de Pb^{2+} , este es un modelo de inducción de neurotoxicidad *in vivo*, por la exposición a acetato de Pb^{2+} vía oral en solución a distintas concentraciones (250, 500 y 1000 ppm de acetato de Pb^{2+}), debido a la solubilidad de la sal en agua permite que el Pb^{2+} pueda absorberse por vía digestiva. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular en hipocampo; así como la acumulación de Pb^{2+} en sangre lo que permitirá obtener la concentración Pb^{2+} a la cual se produce daño neuronal.

Este estudio permitió establecer un modelo de intoxicación por plomo *in vivo* por la administración de acetato de Pb^{2+} por vía oral, lo que permitirá posteriormente establecer nuevas estrategias de estudio de las vías de señalización involucradas en este proceso y establecer una correlación con eventos asociados a la muerte neuronal bajo este modelo de inducción de neurotoxicidad por exposición a Pb^{2+} .

HIPÓTESIS

En las ratas expuestas a plomo, en la etapa perinatal, se induce daño neuronal en el hipocampo, existiendo una correlación directa con los niveles de Pb^{2+} en sangre.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de plomo en sangre y viabilidad en células del hipocampo de rata sometidas a un tratamiento de intoxicación controlado de Pb^{2+} por la ingesta de agua conteniendo acetato de plomo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar los niveles de plomo en sangre, mediante un estudio de espectrofotometría de absorción atómica.
2. Determinar el efecto del Pb^{2+} en el peso corporal debido a la ingesta de agua conteniendo acetato de plomo.
3. Determinar el efecto tóxico del Pb^{2+} , sobre la viabilidad en células en el hipocampo.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL

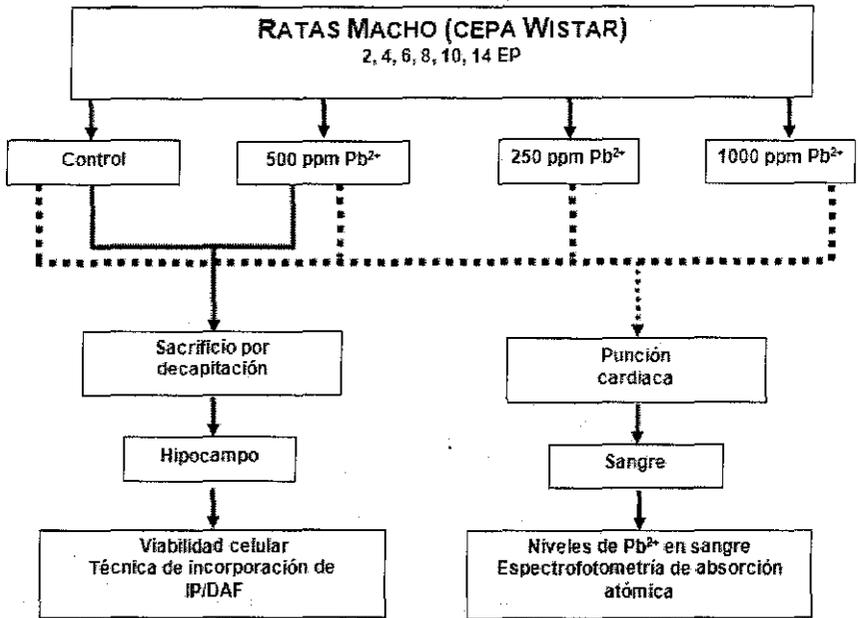


Figura 3. Diagrama general de trabajo en donde se muestran los diferentes grupos de estudio, técnicas y dosis de Pb²⁺ utilizadas en este estudio.

METODOLOGÍA

REACTIVOS UTILIZADOS

Los reactivos utilizados para el desarrollo de este trabajo fueron los siguientes: para el análisis de Pb^{2+} en sangre: Tritón X-100 (Octil-fenoxi-polietoxietanol), pirrolidinditiocarbamato de amonio, isobutilmetilcetona (99%), nitrato de plomo (II), ácido nítrico (69.5%) y heparina; todos los reactivos utilizados son de grado analítico y el agua bidestilada, además con un contenido de plomo menor a 0.00001% excepto por el nitrato de plomo (II) y acetato de plomo.

Para el análisis de viabilidad celular se utilizaron: cloruro de sodio (99%), cloruro de potasio (99%), fosfato de sodio (99%), fosfato de potasio (99%), diacetato de fluoresceína (DAF), inhibidor de tripsina, yoduro de propidio (95%) (IP), DNAsa I, Hank's, tripsina. Estos reactivos fueron de la marca Sigma-Aldrich de grado biología molecular, y el agua destilada y estéril.

Otros reactivos como la acetona (99.6%) y el acetato de plomo (99.4%) fueron de la marca Fermont.

MATERIAL BIOLÓGICO Y TRATAMIENTOS

Los experimentos de análisis de Pb^{2+} en sangre y viabilidad celular en hipocampo se realizaron en un modelo *in vivo*, en ratas de la cepa Wistar, hembras gestantes de 60 días de edad, de las crías solo se utilizaron los machos para el estudio, para eliminar la variable de los cambios hormonales que se dan en las hembras. Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio luz-oscuridad 12x12h, temperatura $23\pm 1^{\circ}C$ y humedad relativa del 40% con libre acceso al agua y alimento, hasta la edad de sacrificio.

Las condiciones de cuidado, alimentación, limpieza, ventilación y tratamiento de animales de laboratorio fueron cuidadosamente observadas, de acuerdo con la Ley General de Salud (Leyes y códigos de México) para la protección de animales, NOM 064, 1999 ZOO, lo cual está de acuerdo con la guía de los Institutos

Nacionales de Salud para el cuidado y uso de los animales de laboratorios de los Estados Unidos de América.

PROTOCOLO DE EXPOSICIÓN A Pb^{2+}

A las madres gestantes se les suministró en el agua de beber una solución de acetato de Pb^{2+} *ad libitum*, desde el primer día de gestación, continuando el tratamiento después del nacimiento de las crías y hasta el día de su sacrificio, las crías fueron expuestas al Pb^{2+} a través de la madre por vía transplacentaria en la gestación y por lactancia después del nacimiento.

Los animales fueron divididos en cuatro grupos de estudio:

- Grupo I: Control, recibieron agua purificada.
- Grupo II: Se les administró agua con acetato de Pb^{2+} , a una concentración de 250 ppm.
- Grupo III: Se les administró agua con acetato de Pb^{2+} , a una concentración de 500 ppm.
- Grupo IV: Se les administró agua con acetato de Pb^{2+} , 1000 ppm.

En cada uno de los grupos se evaluó los niveles de plomo en sangre, la viabilidad celular en hipocampo y peso corporal; a diferentes edades: 2, 4, 6, 8, 10 y 14 días EP, de los cuatro grupos experimentales, la "n" experimental fué de 3 para todos los experimentos.

Las soluciones de Pb^{2+} fueron preparadas con agua destilada y acetato de Pb^{2+} ($Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$) y se agitaron hasta la disolución total de la sal (Apéndice 1).

ANÁLISIS DE PLOMO EN SANGRE

1. TOMA DE MUESTRAS

Para evaluar los niveles de Pb^{2+} , los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/Kg de peso corporal), posteriormente se hizo la sangría total por el método de punción cardíaca (Apéndice 2), colectando la sangre en tubos

de polipropileno heparinizados. Las muestras se mantuvieron en congelación a -20°C, hasta el día del análisis.

2. LIMPIEZA DEL MATERIAL

Todo el material de vidrio utilizado en el análisis, después de su lavado, se mantuvo sumergido durante varios minutos en ácido nítrico 1:1 y después fue cuidadosamente enjuagado con agua bidestilada.

3. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

Los niveles de Pb^{2+} se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica (Modelo Variam FS-220), basado en el método 8003 de NIOSH para la determinación de Pb^{2+} en sangre y redactado según ISO 78/2, de acuerdo con el reglamento para la prevención de riesgos y protección de la salud de los trabajadores por la presencia de plomo metálico y sus compuestos iónicos en el ambiente de trabajo (OM de 9 Abril de 1986, BOE 24-4-1986), en su artículo 11º, punto 1, indica que la determinación de los niveles de Pb^{2+} en sangre se realizó con una fiabilidad (a un nivel de confianza del 95 por 100), de ± 15 por ciento ó ± 6 $\mu g/dL$ para valores inferiores a 40 $\mu g/dL$.

4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- 4.1.** Antes del análisis y una vez alcanzada la temperatura ambiente, la sangre se homogenizó mecánicamente con un vortex durante un minuto.
- 4.2.** Se colocó 3 mL de sangre en tubos de ensayo de tapón roscado.
- 4.3.** Se añadieron 0,8 mL de disolución de Tritón X-100/APDC y se agitó mecánicamente durante 10 segundos.
- 4.4.** Se añadieron 2 mL de isobutilmetilcetona (MIBK) y se agitaron manualmente durante 2 minutos.
- 4.5.** Se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. Se repitió la operación si la separación de las fases orgánica y acuosa no era completa.

Nota: El complejo APDC-Pb en MIBK es poco estable por lo que el análisis se efectuaba lo antes posible y en cualquier caso antes de las dos horas siguientes.

5. PREPARACIÓN DE PATRONES Y CURVA DE CALIBRACIÓN

5.1. Se prepararon las disoluciones de trabajo de 0.4, 0.8, 1 y 1.2 $\mu\text{g Pb/mL}$ (Apéndice 3).

5.2. Se colocó 3 mL de cada una de estas disoluciones en tubos de ensayo con tapón roscado.

5.3. Se siguió las operaciones indicadas para el tratamiento de las muestras a partir del punto **4.3**.

5.4. Se preparó un blanco de agua bidestilada, y se sometió al mismo tratamiento que las muestras y patrones. La lectura obtenida para el blanco se sustrajo de las obtenidas para muestras y patrones.

5.5. Con las lecturas obtenidas para los patrones según el punto **6** corregidas con el valor del blanco, se construyó el gráfico señal-concentración.

6. DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

6.1. Se optimizaron las condiciones instrumentales para disolventes orgánicos, teniendo en cuenta, que para evitar la aparición de coloración amarilla en la llama por exceso de combustible, debido a la presencia de MIBK, se disminuía la aportación de acetileno hasta lograr una relación de flujos y coloración de llama adecuados (azul).

6.2. Se aspiró el extracto orgánico, procedente de la centrifugación a la llama de aire-acetileno y se midió las absorbancias registradas a 283.3 nm de muestras, patrones y blanco.

Notas: Dadas las características especiales de la llama en este análisis, fue necesario la vigilancia continua, para evitar que se produjera un escape de acetileno, en caso de que se apagara. Entre una determinación y otra se aspiraba MIBK saturada con agua.

7. CÁLCULOS

7.1. La concentración de Pb^{2+} en sangre de cada muestra se determinó directamente por interpolación de la lectura obtenida, restando el blanco, en la curva de calibración.

7.2. Los resultados, expresados en μg de Pb^{2+} por 100 mL de sangre mediante la siguiente expresión:

$$C = c \times 100$$

C = concentración de Pb en $\mu g/100$ mL de sangre.

c = concentración de Pb en $\mu g/mL$, leída en la curva de calibración.

EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR

La muerte neuronal se evaluó por un ensayo de viabilidad celular (Jones y cols., 1985; Schlemmer y cols., 2002) que se realizó de acuerdo al protocolo siguiente (Apéndice 4):

1. Las crías se sacrificaron por decapitación, se disectó el hipocampo en condiciones de asepsia.
2. Los hipocampos se colocaron en cajas de petri con 1mL de solución Hank's con Mg^{2+} y Ca^{2+} , posteriormente se realizó un lavado con la solución Hank's con Mg^{2+} y Ca^{2+} y se trituraron con 1mL de la misma, con ayuda de tijeras.
3. Se adicionó DNAsa I (150U) y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente.
4. El contenido tisular se colocó en un tubo eppendorf, al cual se le adicionó 100 μL de solución de tripsina 1:10, la suspensión se incubó a 37 °C durante 10 minutos.
5. Trascorrido el tiempo de incubación, se adicionó 100 μL de inhibidor de tripsina para neutralizar la reacción y el contenido se resuspendió mecánicamente.
6. Se centrifugó por un tiempo de 10 minutos a 200 g a temperatura ambiente.

7. Se desechó el sobrenadante cuidadosamente con una micropipeta y al sedimento se le agregó 200 μL de Hank's, 100 μL de solución de trabajo de diacetato de fluoresceína (DAF) y 30 μL de la solución de yoduro de propidio (IP).
8. Las células se tiñeron por 3 minutos a temperatura ambiente y se colocó el tubo sobre hielo hasta el conteo, se resuspendió y se tomaron 20 μL de la suspensión celular teñida y se colocó en el hemocitómetro, se realizaron tres conteos por experimento.
9. Las suspensiones celulares, se observaron en un microscopio de fluorescencia (Olimpus BX51 con un filtro de absorción Alexa 488-594 con banda estrecha). Las células viables mostraban fluorescencia verde y las células muertas mostraban fluorescencia roja. El DAF proporciona tinción a células viables, mostrando fluorescencia verde, mientras que el IP no puede pasar hacia el interior de células cuando la membrana celular se mantiene intacta. Si la membrana se encuentra dañada, las células pierden la capacidad de retener el DAF, y además el IP entra a la célula y la tiñe, resultando en una intensa fluorescencia roja.

EVALUACIÓN DE PESO CORPORAL

Los animales se pesaron cada 48 h desde su nacimiento hasta el día de sacrificio: 2, 4, 6, 8, 10 y 14 EP respectivamente, de cada uno de los grupos de estudio, para lo cuál se empleó una balanza analítica de la marca Precisa modelo BJ410C.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La "n" experimental fue de 3 (ver figura 3), en todos los grupos de trabajo y para el análisis de viabilidad celular los experimentos se realizaron por triplicado. Todos los datos se compararon entre los diferentes grupos de estudio. Se realizó la prueba de ANOVA de una vía y la prueba χ^2 para las comparaciones entre grupos. Se consideró una $p < 0.01$ como significativa. Los resultados se expresan como la $\bar{x} \pm em$.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PLOMO EN SANGRE

En todos los grupos expuestos a plomo, los niveles de plomo en sangre fueron significativamente altos en relación al grupo control, mismos que no se detectó Pb^{2+} en sus muestras. Además, en los grupos expuestos a plomo se observaron diferencias entre cada uno ellos. En el grupo expuesto a 250 ppm se observó un aumento gradual desde 16 hasta 38 $\mu g Pb^{2+}/dL$ del día 2 a 8 de EP, mientras que del día 10 al 14 de EP se mantuvo con un nivel promedio de 39 $\mu g Pb^{2+}/dL$. El grupo expuesto a 1000 ppm, mostró un incremento desde los 2 hasta los 10 días de EP superando una concentración de 70 $\mu g/dL$ y un decremento a 65 $\mu g/dL$ a los 14 días de EP. El grupo expuesto a 500 ppm mostró un efecto de aumento continuo a través de todas las edades, con una concentración de 27 $\mu g/dL$ en el día 2 de EP, hasta un máximo de concentración de 52.74 $\mu g/dL$ a los 14 días de EP. En la Figura 4 son mostrados los resultados para cada una de las edades a las diferentes concentraciones de Pb^{2+} de las soluciones empleadas como agua de beber.

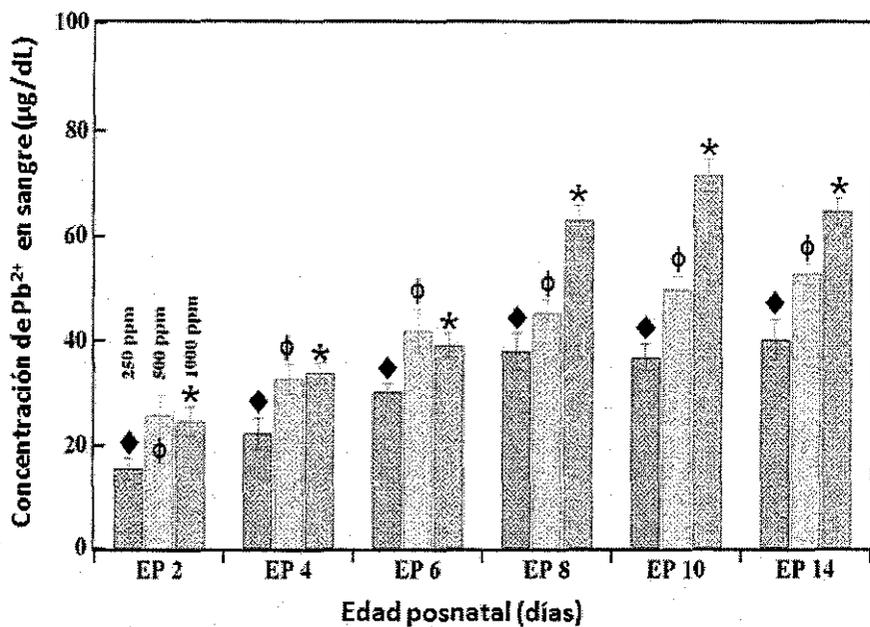


Figura 4. Niveles de Pb^{2+} en sangre, obtenidos por espectrofotometría de absorción atómica, de ratas tratadas con acetato de Pb^{2+} (250, 500 y 1000 ppm). Se grafica la concentración de Pb^{2+} en $\mu\text{g/dL}$ de sangre, con respecto de la edad posnatal ($n=3$). Se consideró una $p < 0.01$ como significativa.

◆ Control vs 250 ppm

⊕ Control vs 500 ppm

* Control vs 1000 ppm

EVALUACIÓN DE PESO CORPORAL

En la figura 5 se muestran los resultados del cambio en peso corporal de las crías expuestas a Pb^{2+} y control, los grupos expuestos a 250 y 500 ppm no mostraron cambios significativos en relación al grupo control. Sin embargo, en el grupo expuesto a 1000 ppm, mostró baja del peso corporal a partir del día 8 de EP con un porcentaje de 16.98% en relación al grupo control, siendo más severo en el día 10 de EP con un porcentaje de 46.10% con respecto del grupo control.

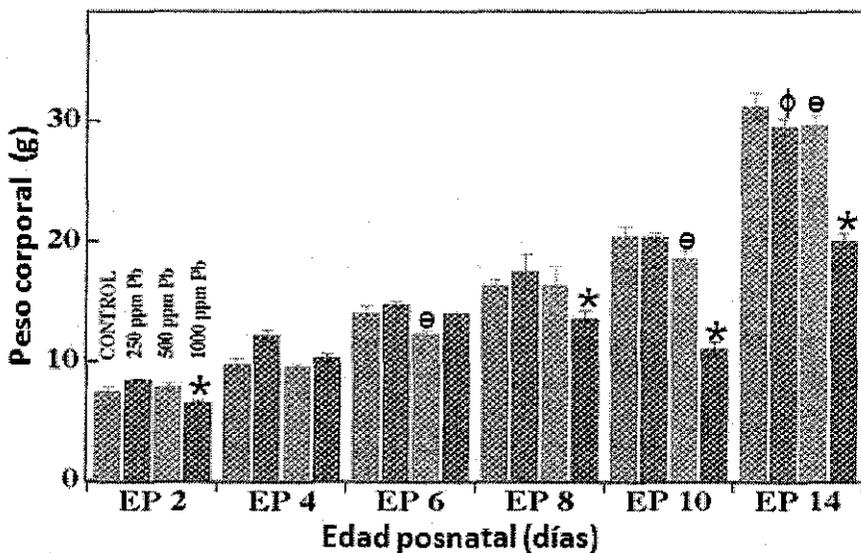


Figura 5. La gráfica muestra el peso corporal de ratas de los cuatro diferentes grupos de estudio (Control, 250, 500 y 1000 ppm de Pb^{2+}). Se grafica en g, con respecto de la edad posnatal ($n=3$). Se consideró una $p < 0.01$ como significativa.

φ Control vs 250 ppm

⊖ Control vs 500 ppm

* Control vs 1000 ppm

ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para el análisis del daño neuronal en células de hipocampo, se consideró a las células que mostraron fluorescencia verde como células viables y las que mostraron fluorescencia roja como células muertas o no viables (Figura 6). De esta forma se evaluó a las edades de 2, 4, 6, 8, 10 y 14 días de EP.

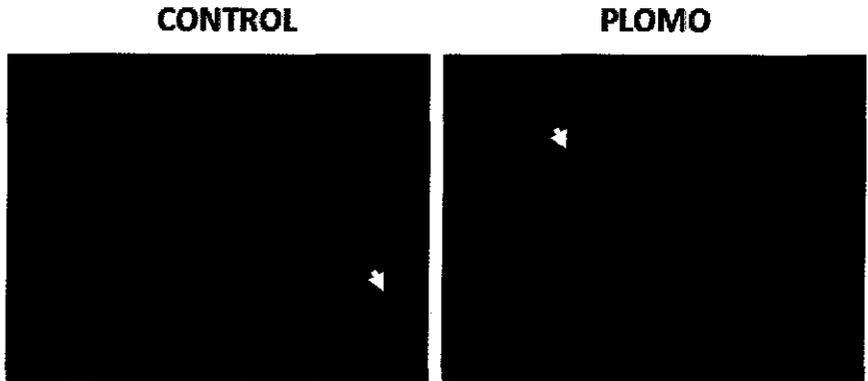


Figura 6. Fotomicrografías representativas de las suspensiones celulares de hipocampo de rata, en el grupo tratado con Pb^{2+} (500 ppm) y el control. Las marcas verdes representan las células viables (flecha blanca) y las marcas rojas las células no viables (flecha negra).

En el grupo control las diferencias entre las distintas edades evaluadas no fueron significativas, se presentó un promedio de 23.78% de células no viables. Los resultados muestran que el tratamiento con acetato de Pb^{2+} indujo baja en el número de células viables en relación al grupo control, este efecto fué más notorio en el día 4 de EP, en donde se observó una aumento del porcentaje de células no viables del 21.03% del grupo experimental con respecto al grupo control. En contraste, en el día 8 de EP no hubo cambios significativos entre los grupos de estudio. En el día 2 de EP hubo baja en la viabilidad celular del 13.63%, mientras del día 6, 10 y 14 de EP el número de células viables bajó desde 9.25, 15.37 y 12.03% respectivamente, en relación al grupo control (Ver figura 7).

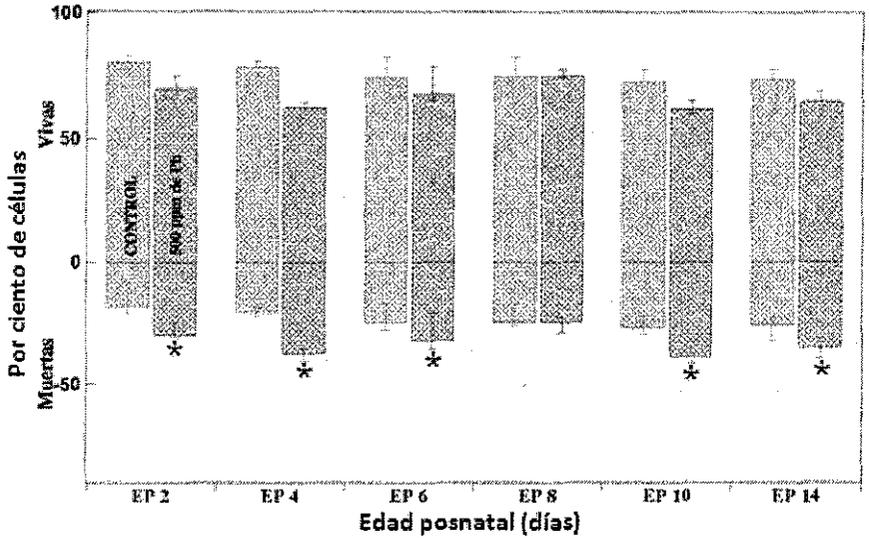


Figura 7. Efecto de la exposición a acetato de Pb^{2+} (500 ppm) en la viabilidad celular en células de hipocampo de rata. Se grafica el porcentaje de células con respecto de la edad posnatal, cada barra representa el 100% de las células en el conteo ($n=3$). Se consideró una $p < 0.01$ como significativa.

* Control vs 500 ppm

TESIS/CUCBA

DISCUSIÓN

El SN es susceptible a los efectos tóxicos inducidos por compuestos químicos potencialmente neurotóxicos, dentro de estos se encuentra el Pb^{2+} . Diversos estudios han mostrado que el efecto tóxico del Pb^{2+} se debe a la gran afinidad por los sitios de unión para cationes polivalentes en las proteínas celulares, el efecto tóxico causado por el Pb^{2+} depende de la concentración en la que se encuentre presente. Al estudiar el efecto del Pb^{2+} sobre las células, estamos viendo la suma de múltiples alteraciones que ocurren en forma simultánea en la fisiología celular.

El objetivo principal de este trabajo fue la utilización de un modelo *in vivo* en rata de la cepa Wistar, en la evaluación de la neurotoxicidad inducida por la exposición perinatal a acetato de plomo, en hipocampo de rata, evaluando los niveles de Pb^{2+} en sangre y la viabilidad celular en hipocampo. Estos experimentos se diseñaron con el objetivo de caracterizar un modelo de intoxicación crónica por la exposición de acetato de Pb^{2+} *in vivo*, en el que no se presenten otros síntomas como la baja de peso corporal debido a trastornos gastrointestinales, esto representa un modelo subclínico de intoxicación por Pb^{2+} .

El análisis de espectrofotometría de absorción atómica, demostró un incremento de la concentración de Pb^{2+} en sangre tras la exposición a acetato de plomo en la etapa perinatal. La concentración de Pb^{2+} en sangre mostró un patrón de aumento directamente proporcional en relación a la dosis administrada en todos los grupos expuestos a Pb^{2+} . Por otro lado, el grupo expuesto a 1000 ppm mostró un aumento relativamente alto después del día 8 de EP llegando hasta una concentración máxima de 72 μg de Pb^{2+}/dL , este aumento se relacionó directamente con baja del peso corporal a partir de el día 8 de EP, mientras que en los grupos expuestos a 250 y 500 ppm de Pb^{2+} , no se presentaron cambios significativos en el peso corporal en relación al grupo control. En contraste, en otro trabajo, donde la exposición a Pb^{2+} fue a través del alimento (750 ppm de acetato de Pb^{2+}) los niveles

de Pb^{2+} en sangre evaluados en este estudio fueron más bajos, de: $13.9 \pm 2.8 \mu\text{g/dL}$ (Guilarte y cols., 1993).

En base a los resultados obtenidos en el análisis de la concentración de Pb^{2+} en sangre y de la evaluación del peso corporal, se decidió utilizar la dosis de 500 ppm para el análisis de viabilidad celular.

La determinación de la viabilidad celular es importante en el estudio de citotoxicidad, existen varios ensayos de viabilidad aceptados, entre estos se encuentra la tinción con azul tripano, esta técnica es la prueba más común para ensayos de viabilidad celular, pero puede ser inexacta en la identificación de las células muertas, debido a que las células deben contarse dentro de 3-5 minutos, ya que el número de células teñidas aumenta con el tiempo después de la adición del colorante. El tiempo es menos crítico cuando se utiliza eosina Y, pero la identificación de las células muertas es subjetivo. La nigrosina es menos tóxica, pero la tinción requiere por lo menos 10 minutos y, por tanto, lleva más el tiempo realizar el conteo.

La técnica de tinción con DAF y IP es un procedimiento simultáneo de doble tinción que se pueden realizar en 5 minutos, que se puede realizar sobre las suspensiones celulares y pueden ser evaluado por microscopía de fluorescencia, además el conteo celular se puede llevar a cabo dentro de 5-40 minutos después de la tinción.

En el análisis de viabilidad celular se observó aumento en el número de células no viables en el hipocampo, mostrando mayor susceptibilidad en el día 4 de EP, en el que la disminución de células viables fue de 21.03%. A diferencia en el día 8 de EP no hubo cambios entre el grupo control y el expuesto a Pb^{2+} . En contraste, en cultivos de neuronas expuestos a concentraciones de 1 y 3 μM Pb^{2+} reportaron incremento de la viabilidad celular (Davidovics y cols., 2005), esto puede deberse a diferencias entre los modelos experimentales.

La baja en la viabilidad celular generada por la exposición a plomo en la etapa de desarrollo, demuestran que el Pb^{2+} tiene un efecto neurotóxico importante, probablemente por la capacidad de pasar la placenta y la barrera hematoencefálica, esto podría inducir cambios en la diferenciación y sinaptogénesis que se dan en esta

etapa, además los niveles de Pb^{2+} presentes en sangre se relacionan con los reportados en la exposición infantil a Pb^{2+} relacionada con alteraciones neurológicas y cognitivas (Bellinger, 2004), esto sugiere su acción directa en el hipocampo. En un estudio realizado, por nuestro equipo de trabajo (Franco y cols., 2007), bajo el mismo modelo de estudio del presente trabajo, se reportó un mayor número de células con características morfológicas anormales en el hipocampo de ratas que recibieron acetato de plomo con respecto a los animales control, siendo este efecto más significativo en el día 4 EP y en particular en la región CA2 del hipocampo; por otro lado en el día 8 EP no se presentaron diferencias significativas al comparar ambos grupos, estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente análisis de viabilidad celular.

Entre los daños causados por el Pb^{2+} en el SN, podemos mencionar la peroxidación de lípidos, excitotoxicidad, alteraciones en la síntesis, almacenamiento y liberación de neurotransmisores, en la expresión y el funcionamiento de receptores, alteraciones en el metabolismo mitocondrial, interferencia con segundos mensajeros, daños en endotelio cerebrovascular, astrogliosis y oligodendrogliosis, causando defectos en la mielinización, interferencia en los receptores NMDA. Sin embargo, el mecanismo exacto de neurotoxicidad en hipocampo inducido por Pb^{2+} no es claro y es necesario su estudio, especialmente *in vivo*. Este modelo debe ser tomado como punto de partida para estudios de la neurotoxicidad mediada por Pb^{2+} y facilitar el estudio de los mecanismos fisiológicos y moleculares que son alterados por el Pb^{2+} .

CONCLUSIONES

La administración de acetato de Pb^{2+} en etapa perinatal, induce:

- Aumento en la concentración de Pb^{2+} en sangre con un efecto dosis y edad dependiente en los grupos expuestos a Pb^{2+} .
- Un incremento en el número de células muertas en hipocampo con respecto al grupo control siendo más notorio en el día 4 de EP.
- Los datos del análisis de peso corporal indican una relación inversamente proporcional con los niveles de Pb^{2+} encontrados en sangre.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

SOLUCIONES DE ACETATO DE PLOMO

1) 250 ppm de Pb^{2+}

Acetato de plomo 454.95 mg

Agua destilada Aforar a 1 L

- Se mezcló el acetato de plomo con 500 mL de agua destilada, se agitó hasta disolver y se adicionó el resto del agua hasta aforar a 1 L. Después de esto se dejaba agitando 12 h, con un agitador magnético.

2) 500 ppm de Pb^{2+}

Acetato de plomo 920.9 mg

Agua destilada Aforar a 1 L

- Se mezcló el acetato de plomo con 500 mL de agua destilada, se agitó hasta disolver y se adicionó el resto del agua hasta aforar a 1 L. Después de esto se dejaba agitando 12 h, con un agitador magnético.

3) 1000 ppm de Pb^{2+}

Acetato de plomo 1841.8 mg

Agua destilada Aforar a 1L

- Se mezcló el acetato de plomo con 500 mL de agua destilada, se agitó hasta disolver y se adicionó el resto del agua hasta aforar a 1 L. Después de esto se dejaba agitando 12 h, con un agitador magnético.

APÉNDICE 2

TÉCNICA DE PUNCIÓN CARDIACA

La punción cardiaca se llevo acabo bajo anestesia general. Se tumbo al animal en posición dorsoventral y se introdujo la aguja justo debajo del esternón hasta el corazón. La punción se realizo con una jeringa de 1 mL, con aguja de 16 mm. Para asegurar la muerte del animal, después del procedimiento, se realizó una incisión en el corazón.

APÉNDICE 3

REACTIVOS PARA DETERMINACIÓN DE PLOMO EN SANGRE

- 1) **Disolución tritón X-100/APDC:** (20 g/L de APDC, y 2,5% (V/V) de Tritón X-100). Se disolvió 4 g de APDC en 40 mL de agua y se añadió 5 mL de Tritón X-100. Se aforó a 200 mL con agua. La disolución, de presentar turbidez se filtró previo a su utilización. Dada su inestabilidad se preparó la disolución antes de realizar el análisis.
- 2) **Isobutilmetilcetona saturada con agua:** Se mezcló 900 mL de MIBK con 100 mL de agua, agitando hasta conseguir la saturación, y se dejó reposar durante 1 h para separar la fase orgánica.
- 3) **Disolución patrón de plomo de 1000 mg/mL:** Se secó nitrato de plomo (II) a 120 °C durante 4 h y se dejó enfriar en desecador. Se pesaron 1,598 g y se disolvió en ácido nítrico al 1 % (V/V) hasta completar 1 L de disolución.
- 4) **Disoluciones de trabajo:** Se preparó una disolución intermedia de 10 µg Pb/mL, se tomó 1 mL de la disolución patrón del punto 3 y se diluyó a 100 mL.
- 5) De la disolución de 10 µg Pb/mL se tomaron alícuotas de 4, 8, 10 y 12 mL, y se aforaron a 100 mL con agua, obteniéndose las disoluciones de trabajo de 0.4, 0.8, 1 y 1.2 µg Pb/mL.

APÉNDICE 4

REACTIVOS PARA VIABILIDAD CELULAR

1) PBS 0.310 Osm, pH 7.2

NaCl	7.6 g
Na ₂ HPO ₄	1.075 g
NaHPO ₄	0.3 g
Agua destilada estéril	aforar 1 L

2) Hank's y Hank's con Ca²⁺ y Mg²⁺ pH 7.4

Sal balanceada de Hank's	9.8 g
NaHCO ₃	0.35 g
Agua destilada estéril	a 1 L

- Se midió el 90% del volumen final de agua. Se agregó el polvo, mientras se agitó hasta disolver.
- Se enjuagó el frasco del polvo y se adicionó a la solución anterior.
- Se agregó 0.35 g de bicarbonato de sodio a la solución anterior y se agitó hasta disolver.
- Mientras, se agitaba, se ajustó el pH de 0.1-0.3 unidades de pH con HCl 1N.
- Se adicionó el resto del agua, hasta que se completó 1 L.
- Se esterilizó inmediatamente con una membrana de nitrocelulosa con porosidad de 0.22 µm.
- Se almacenó en un frasco estéril a 4 °C.

Nota: La temperatura del agua fue de 20 °C. Si se observó algún cambio en el color de la solución almacenada, se desechó.

3) DNAasa I (150 U/alícuota)

DNAasa I	2.5597 mg (7500 U)
Hank's con Ca ²⁺ y Mg ²⁺	2000 µL

- Se disolvió la DNAasa I en el Hank's con Ca²⁺ y Mg²⁺ y se mezcló en vortex.

- Se realizaron alícuotas de 40 μ L cada una (150 U) y se almacenó a -20 °C.

Nota: Todo el proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar.

4) Tripsina 1:10

Tripsina ----- 100 μ L

Hank's con Ca^{2+} y Mg^{2+} ----- 900 μ L

- Se mezcló la tripsina con el Hank's y se almacenó a -20 °C.

5) Inhibidor de tripsina 1:10

Inhibidor de tripsina ----- 1 mg

Agua destilada estéril ----- 1 mL

- Se mezcló la tripsina con el agua y se almacenó a -20 °C.

6) Yoduro de propidio.

IP ----- 1 mg

PBS estéril----- 1 mL

- Se mezcló el IP con el PBS en vortex y se almacenó a 4 °C, protegido de la luz.

7) Diacetato de Fluoresceína (solución stock)

DAF----- 5 mg

Acetona----- 1 mL

- Homogenizar en vortex y almacenar a 4 °C, protegido de la luz.
- Solución de trabajo: Se adicionó 4 μ L de la solución stock en 1 mL de PBS y se homogenizó por inversión suave.

Nota: Se protegía de la luz y se preparaba cada vez que se utilizaba, nunca se almacenó.

BIBLIOGRAFÍA

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

Bellinger DC. (2004). Lead. *Pediatrics*. 113(4):1016-1022.

Berglund m, Akesson A, Bjellerup P, Vahter M. (2000). Metal bone interactions. *Toxicology letters*. 112-113: 219-225.

Bernal J, Lee JH, Cribbs LL, Perez-Reyes E. (1997). Full reversal of Pb^{++} block of L-type of Ca^{++} channels requires treatment with heavy metals antidotes. *Journal of pharmacology Exp. Ther.* 282:172-180.

Bressler J, Kim K, Chakraborti T y Goldstein G. (1999). Molecular mechanism of lead neurotoxicity. *Neurochemical research*. 24 (4):595-600.

Bressler JP y Goldstein GW. (1991). Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochemical Pharmacology*. 41:479-484.

Brouwer H. (2005). Screening technique for lead and cadmium in toys and other materials using atomic absorption spectroscopy. *Journal of chemical education*. 82(4):611-612.

Burger J, Díaz F, Marfante E, Pounds JG, Robson M. (2003). Methodologies to examine the importance of host factors in bioavailability of metals. *Ecotoxicology and environmental safety*. 56:20-31.

Busselberg D, Platt B, Michael D, Carpenter DO, Hass HL. (1994). Mammalian voltage-activated calcium channel currents are blocked by Pb^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} . *Journal of neurophysiology*. 71:1491-1497.

Calderón JV, Hernández C, Valdez B, Maldonado M y López A. (1996). Evolution of lead toxicity in a population of children. *Human and experimental toxicology*. 15:376-382.

Calderón JV, Ortiz D, Yáñez L, Díaz F. (2003). Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors. *Ecotoxicology and environmental safety*. 56: 93-103.

Canfield RL, Henderson CR Jr., Cory-Slechta DA, Cox C, Jusko TA, Lanphear BP. (2003). Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 micrograms per decilitre. *N Engl J Med*. 348: 1517-1526.

Caussy D, Gochfeld M, Gurzau E, Neagu C, Ruedel H. (2003). Lessons from case studies of metals: investigating exposure, Bioavailability, and risk. *Ecotoxicology and environmental safety*. 56:45-51.

Chao SL, Moss JM, Harry GJ. (2007). Lead-Induced alterations of apoptosis and neurotrophic factor mRNA in the developing rat cortex, hippocampus, and cerebellum. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 21(5):265-272.

Cohn J, Cory-Slechta. (1994). Lead exposure potentiates the effects of NMDA on repeated learning. *Neurotoxicology and teratology*. 6 (5):455-465.

Collingridge GL, Singer W. (1990). Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *TIPS*. 11:290-296.

Cory- Slechta DA. (1995). Relationships between lead induced learning impairments and changes in dopaminergic, cholinergic and glutamatergic neurotransmitter system functions. *Annual review of pharmacology toxicology.* 35:391-415.

Costa LG. (1998). Signal transduction in environmental neurotoxicity. *Pharmacology and toxicology.* 38:21-43.

Díaz F, Batres L, Calderón J, Lugo A, Galvao L, Lara L, Rizo P, Arroyave ME, McConnell R. (1997). The El Paso smelter twenty years later: residual impact on Mexican children. *Environmental research.* 74:11-16.

Davidovics Z, DiCicco-Bloom E. (2005). Moderate lead exposure elicits neurotrophic effects in cerebral cortical precursor cells in culture. *Journal of neuroscience research.* 80(6):817-25

Franco N, Orta E, Rivera M, Feria A, Reyes J. (2007). Estudio neurotoxicológico en el hipocampo de ratas expuestas a la ingesta de agua contaminada con iones plomo: un análisis morfológico. *L Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Puebla, 9-13 de septiembre.* C-226.

García G, Ramírez V, Balderas I, Sandoval J, Escobar M, Ríos C, Bermúdez F. (2004). Cognitive deficits in adult rats by lead intoxication are related with regional specific inhibition of cNOS. *Behavioural Brain Research.* 149:49-59.

Garza A, Chávez H, Vega R, Soto E. (2005). Mecanismos celulares y moleculares de la neurotoxicidad por plomo. *Salud mental.* 28(2):48-58.

Gerson B. (1990). Lead. *Clinical laboratory in Medicine.* 10:441-457.

Gilbert ME, Mack CM, Lasley SM. (1996). Chronic developmental lead exposure increases the threshold for long-term potentiation in rat dentate gyrus *in vivo*. *Brain research*. 736:118-124.

Guilarte TR, Miceli RC. (1992). Age-dependent effects of lead on [³H]-MK-801 binding to the NMDA receptor-gated ionophore: *in vitro* and *in vivo* studies. *Neurosciences letter*. 148:27-3

Guilarte TR, Miceli RC, Altmann L, Weinsberg F, Winneke G, Wiegans H. (1993). Chronic prenatal and postnatal Pb²⁺ exposure increases [³H]-MK-801 binding sites in adult rat forebrain. *Eur. Pharm. Environm. Toxicol Pharm Section*. 228:273-275.

Harry GJ, Schmitt TJ, Gong Z, Brown H, Zawia N, Evans HL. (1996). Lead-induced alterations of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the developing rat brain. *Toxicology and applied pharmacology*. 139:84-93.

Jadhav AL, Ramesh GT, Gunasekar PG. (2000). Contribution of protein kinase C and glutamate in Pb²⁺-induced cytotoxicity. *Toxicology letters*. 115:89-98.

Jones KH, Senft JA. (1985). An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetato-propidium iodide. *Journal of histochemistry and cytochemistry*. 33(1):77-79.

Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM. (2000). *Principles of neural science*. Mc Graw Hill. Cuarta edición. USA.

Klaassen CD, Watkin JB III. (1999). *Manual de toxicología. La ciencia básica de los tóxicos*. Quinta edición. Mc Graw Hill-Interamericana. México.

Kuhlmann AC, McGlothlan JL, Guilarte TR. (1997). Developmental lead exposure causes spatial learning deficits in adult rats. *Neuroscience letters*. 233:101-104.

Lasley SM, Green MC, Gilbert ME. (2001). Rat hippocampal NMDA receptor binding as a function of chronic lead exposure level. *Neurotoxicology and Teratology*. 23(2):185-189.

Lidsky TI, Schneider JS. (2003). Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain*. 126:5-19.

Loikkanen J, Chvalova K, Naarala J, Vähäkangas KH, Savolainen KM. (2003). Pb^{2+} -induced toxicity is associated with p53-independent apoptosis and enhanced by glutamate in GT1-7 neurons. *Toxicology letters*. 144:235-246.

Mason HJ. (2000). A biokinetic model for lead metabolism with a view to its extension to pregnancy and lactation: Further validation of the original model for non-pregnant adults. *Sci. Total Environ*. 246: 69-78.

Mazzolini M, Traverso S, Marchetti C. (2001). Multiple pathways of Pb^{2+} permeation in rat cerebellar granule neurones. *Journal of Neurochemistry*. 79:407-416

Oberto A, Marks N, Evans HL, Guidotti A. (1996). Lead (Pb^{2+}) promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications. *Journal of Pharmacology Exp. Ther*. 279:435-442.

Pounds JG. (1984). Effect of lead intoxication on calcium homeostasis and calcium-mediated cell function: a review. *Neurotoxicology*. 5:295-332.

Ramesh GT, Manna SK, Aggarwal BB, Jadhav AL. (2001). Lead exposure activates nuclear factor kappa B, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase and caspases in rat brain. *Toxicology letters*. 123:195-207.

Raunio S, Tähti H. (2001). Glutamate and calcium uptake in astrocytes after acute lead exposure. *Chemosphere*. 44:355-359.

Rice DC. (1996). Behavioral effects of lead: Commonalities between experimental and epidemiologic data. *Environ health perspectives.* 104:337-351.

Romieu I. (2003). Uso de los datos de plumbemia para evaluar y prevenir el envenenamiento infantil por plomo en Latinoamérica. *Salud pública de México.* 45 (2): 244-251.

Sandhir R, Gill KD. (1994). Effect of lead on the biological activity of calmodulin in rat brain. *Experimental and molecular pathology.* 61:69-75.

Sharifi AM, Baniasadi S, Jorjani M, Rahimi F, Bakhshayesh M. (2002). Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo. *Neuroscience letters.* 329:45-48.

Simons TJB (1993) Lead-calcium interactions in cellular dead toxicity. *Neurotoxicology* 14:77-86.

Simonsen L, Johnsen H, Lund SP, Matikainen E, Midtgård U, Wennberg A. (1994). Evaluation of neurotoxicity data: A methodological approach to classification of neurotoxic chemicals. *Scand J Work Environ Health* 20:1-12.

Schlemmer JE, Matser EJT, De Zeeuw CI, Weber JT. (2002) Repeated mild injury causes cumulative damage to hippocampal cells. *Brain.* 125:2699-2709.

Tanaka M, Marunouchi T. (1998) Immunohistochemical analysis of developmental stage of external granular layer neurons which undergo apoptosis in postnatal rat cerebellum. *Neuroscience letter.* 242:85-88.

Waldron HA. (1979). Lead poisoning from cosmetics. *Lancet* 2:1070-1071.

Wei C, Jun C, Qing-yi W, Xue-min C. (2006). Effects of Brn-3a protein and RNA expression in rat brain following low-level lead exposure during development on spatial learning and memory. *Toxicology letters*. 164:63-70.

Xu J, Ji LD, Xu LH. (2006). Lead-induced apoptosis in PC12 cells: Involvement of p53, Bcl-2 family and caspase-3. *Toxicology letters*. 166(2):160–167.

Zhang J, Xue W, Zhong L, Nian L, Bao Z. (2004). The effects of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid and oligomeric procyanidins on acute lead neurotoxicity in rat hippocampus. *Free radical biology and medicine*. 37(7):1037-1050.

Zhu Z, Yang RL, Dong GJ, Zhao ZY. (2005). Study on the neurotoxic effects of low-level lead exposure in rats. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*. 6B(7):686-692.

BIBLIOTECA CUCBA

BIBLIOTECA CUCBA