

50  
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ALGUNOS ASPECTOS DEL METABOLISMO DE LAS BIOPTERINAS  
EN LA INTOXICACION POR PLOMO

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
BIOLOGO  
PRESENTA  
MA. GUADALUPE DOMINGUEZ MACOUZET

MÉXICO, D. F. 1988.



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ABREVIATURAS

ALA	Acido aminolebulfínico
ATP	Adenosín trifosfato
BH <sub>2</sub>	Dihidrobiopterina
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albúmina sérica bovina
CPII	Cromatografía preparativa de intercambio iónico
DCM	Disfunción cerebral mínima
DODP	6-(1,2-dioxopropil)-7,8-dihidropterina
EDTA	Acido etilendiamino-tetraacético
EEG	Electroencefalograma
EPP	Potencial de placa terminal
FAH	Fenilalanina hidroxilasa
GABA	Acido gama aminobutírico
GAD	GABA descarboxilasa
GAT	GABA transaminasa
GTP	Guanosín-5'-trifosfato
GTP-CH	Guanosín trifosfato ciclohidrolasa
Hb	Hemoglobina
HCl	Acido clorhídrico
6-HODA	6-hidroxidopamina
HPLC	Cromatografía líquida de alta precisión
IQ	Coficiente intelectual
KI	Yoduro de potasio
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MEPP	Potencial miniatura de placa terminal
6MPH <sub>2</sub>	6-metil dihidropterina
m	Contenido cuántico medio
NPTH <sub>2</sub> -P <sub>3</sub>	7,8-dihidroneopterina trifosfato
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato forma reducida
p	Neurotransmisor
QBH <sub>2</sub>	Quinonoide dihidrobiopterina
QPR	Quinonoide dihidrobiopterin reductasa
SNC	Sistema nervioso central
TCA	Acido tricloroacético
TH	Tirosina hidroxilasa
T5H	Triptofano-5-hidroxilasa

## C O N T E N I D O

	Página
INTRODUCCION	1
1. Generalidades	1
2. La intoxicación asintomática	5
3. Bases neuroquímicas de la intoxicación	9
4. La transmisión colinérgica en la intoxicación	10
5. El sistema GABAérgico en la intoxicación	12
6. El sistema catecolaminérgico en la intoxicación	13
7. Las bipterinas en la intoxicación	17
 HIPOTESIS DE TRABAJO	 29
 OBJETIVOS	 29
 METODOLOGIA	 30
1. Intoxicación de los animales	30
2. Obtención del extracto enzimático	30
3. Ensayo enzimático	31
3.1. Actividad de la guanosin trifosfato ciclohidrolasa (GTP-CH)	31
3.2. Oxidación de la 7-8-dihidroneopterina trifosfato (NPTH <sub>2</sub> -P <sub>3</sub> )	32
3.3. Desfosfatación de la neopterina 3 fosfato	32
4. Cuantificación de las pteridinas	33

4.1. Determinación de las pteridinas en:	
a) Tejido cerebral (núcleo caudado)	33
b) Plasma	34
c) Orina	34
4.2. Cromatografía preparativa de intercambio iónico (CPII)	35
a) CPII para purificar las muestras	35
b) CPII para concentrar las muestras	35
4.3. Cromatografía analítica: Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)	36
5. Cuantificación de proteínas	36
6. Procesamiento de datos	36
 RESULTADOS	 38
1. Condiciones espectrofotométricas para cuan- tificar proteínas por el Método Lowry	38
2. Eficiencia de la cromatografía de exclusión para desalar	38
3. Selección del estándar interno para HPLC	40
4. Caracterización del ensayo enzimático	42
4.1. Demostración de la especificidad de la reacción enzimática	42
4.2. Cinética de la GTP-CH	44
4.3. Inhibición de la actividad por adenosín trifosfato (ATP)	44
5. Actividad de la GTP-CH en los animales controles e intoxicados	46
6. Concentración de biopterinas en:	

6.1. Plasma	48
6.2. Núcleo caudado	48
6.3. Orina	49
DISCUSION	50
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFIA	60

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

		Página
Figura 1.	Esquema de la intoxicación con plomo en el hombre.	3
Figura 2.	Estructura química de las pteridinas conjugadas y no conjugadas.	18
Figura 3.	Papel de la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) como cofactor en la síntesis de las aminas biogénicas.	20
Figura 4.	Biosíntesis de la ( $BH_4$ ) en el tejido nervioso.	22
Figura 5.	Esquema de una sinápsis dopaminérgica donde se explica la Hipótesis de Leeming et al. sobre el efecto del plomo a dosis altas en la síntesis de la $BH_4$ .	24
Figura 6.	Esquema de una sinápsis dopaminérgica donde se explica la Hipótesis de Leeming et al. sobre el efecto del plomo a dosis bajas en la recuperación de la $BH_4$ .	25

- Figura 7. Esquema de una sinápsis dopaminérgica donde se explica una hipótesis alternativa a la de Leeming et al. sobre el efecto del plomo en la intoxicación a dosis bajas. 27
- Figura 8. Esquema de una sinápsis dopaminérgica donde se explica otra hipótesis alternativa a la de Leeming et al. sobre el efecto del plomo en la intoxicación a dosis altas. 28
- Figura 9. Espectro de absorbanza para la albúmina sérica bovina (BSA) procesada por el Método de Lowry. 39
- Tabla 1. Eficiencia de las columnas de Sephadex G-25. 40
- Figura 10. Cromatograma de estándares de Neopteri-  
na y 6-metil dihidropterina (6MPH<sub>2</sub>). 41
- Figura 11. Cromatogramas de Neopterina y Biopterina en diferentes condiciones de ensayo. 43
- Figura 12. Cinética de la guanosín trifosfato  
ciclohidrolasa (GTP-CH). 45

Tabla 2.	Actividad de la GTP-CH en el núcleo estriado. .	46
Figura 13.	Inhibición de la GTP-CH por adenosín trifosfato (ATP).	47

## INTRODUCCION

### 1. GENERALIDADES

La intoxicación por plomo, considerada en una época como una enfermedad laboral exclusiva de los trabajadores de la industria manufacturera de acumuladores y de los que utilizan esmaltes y pinturas, constituye ahora un problema serio de salud pública sobre todo para las áreas urbanas y altamente industrializadas (Goyer, 1971; David et al., 1972; Ordoñez et al., 1976; Hilburn, 1979; Chisolm, Jr., 1984; Gallacher et al., 1984; Jones y Gamble, 1984), aunque las poblaciones rurales tampoco están exentas de la infección (Lin Fu, 1973). Cada día es más notoria la frecuencia con que aparecen los reportes de altos niveles de plomo detectados en el plasma de niños que habitan en estas zonas ocasionándoles alteraciones graves en la conducta (Silbergeld y Goldberg, 1973; Needleman, 1983; Cory-Slechta, 1984).

Los síntomas y signos de la toxicidad se manifiestan a partir de concentraciones de plomo de 0.7  $\mu\text{gr/ml}$  de sangre. Cuando los niveles sanguíneos del metal se encuentran en 1  $\mu\text{gr/ml}$  se produce irremediablemente la encefalopatía en niños y la polineuritis en adultos (Perlstein y Attala, 1966; Baker et al., 1984; Plomelli et al., 1984). Cuando son inferiores a los 0.4  $\mu\text{gr/ml}$  es difícil detectar sintomatología que se correlacione con la intoxicación; sin embargo, en los

últimos años se ha reportado que en concentraciones menores a los 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , anteriormente consideradas como inocuas, ya se pueden detectar trastornos metabólicos tales como anomalías en la síntesis de hemoglobina (Hb) (Benk et al., 1970; Alessio et al., 1976; Chisolm Jr., 1978; Silbergeld y Lamon, 1980; Piomelli et al., 1982) disminución de la vitamina D (Rosen et al., 1980; Mahaffey et al., 1982), alteración en la excreción del cortisol (Saenger et al., 1984) y efectos neuroconductuales subclínicos (Needleman et al., 1979; Otto et al., 1981, 1982) (Fig. 1). A los niños con apariencia normal que presentan una concentración sanguínea de plomo más alta que la media poblacional y uno o varios de estos trastornos metabólicos, se les denomina "niños asintomáticos con carga corporal de plomo aumentada" y al síndrome, "intoxicación asintomática" (Piomelli et al., 1984).

En esta tesis no se tomará en cuenta la intoxicación sintomática (saturnismo o plumbismo) causada por la ingestión aguda o crónica de concentraciones altas de plomo porque no representa un riesgo importante para la salud de la población (Smith et al., 1965; Perlestein y Attala, 1966; Piomelli et al., 1984). Esto obedece a que su alarmante sintomatología y la fuente de intoxicación son de tan fácil detección, que conducen con rapidez a un diagnóstico certero que permite establecer con oportunidad medidas de control y preventivas, y hasta

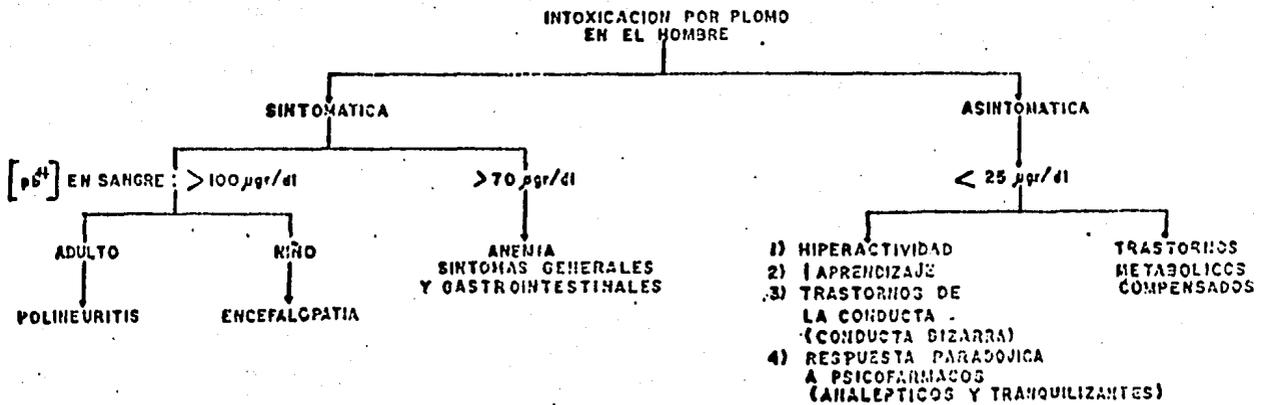


Figura 1. Diagrama de la intoxicación por plomo en el hombre. Los trastornos metabólicos compensados son aquéllos que no son tan severos para presentar sintomatología. La intoxicación asintomática, se detalla en el punto 2 del texto.

disposiciones legales que obligan a reducir el contenido de plomo en algunos productos de consumo como pinturas, gasolinas, etc. (Chisolm Jr., 1984; Piomelli et al., 1984).

Por el contrario, la exposición crónica a concentraciones bajas de plomo compromete de un modo grave a la salud pública (Lin Fu, 1973; Baker et al., 1984), pues el daño orgánico que causa es tan sutil que no expresa síntomas que ameriten atención médica urgente; por ejemplo, no hay anemia severa, ni dolor abdominal, ni síntomas neurológicos como en el saturnismo (Perlstein y Attala, 1966; de la Burde y Choate, 1972; Needleman et al., 1979; Otto et al., 1982; Piomelli et al., 1984). Además, en el caso de la intoxicación crónica a dosis bajas, generalmente, se afecta un sector importante de la población que es el que está expuesto a la contaminación ambiental, producto de los desechos de industrias y de la combustión de los automotores en las grandes ciudades (Hilburn, 1979; Angle et al., 1984). Los infantes representan el grupo de alto riesgo por ser los más susceptibles a este tipo de intoxicación, (Chow y Earl, 1970; Lin Fu, 1973; Needleman et al., 1974) y su sistema nervioso central (SNC) resulta ser el más perjudicado (Otto, 1981). Las secuelas neurológicas son más comunes y peligrosas entre más pequeño es el niño y este hecho también es válido durante la vida fetal (Bardley y Baumgartner, 1958; Perlstein y Attala, 1966; Palmisano, 1969; Scanlon, 1972).

## 2. LA INTOXICACION ASINTOMATICA

Los síndromes que se presentan en humanos y han sido atribuidos a la exposición constante a dosis bajas de plomo desde el nacimiento, son : hiperactividad, deficiencias en el aprendizaje, irritabilidad y agresividad (Chisolm, 1971; David et al., 1972; Lin Fu, 1973; Needleman et al., 1979, 1983).

En 1972 David, Clark y Voeller presentaron evidencias epidemiológicas que correlacionaban la hiperactividad con la exposición al plomo en niños que habitaban en vecindades donde las paredes habían sido pintadas con esmaltes que contenían dicho metal. Esto es congruente con el hecho de que la ingestión de plomo de las pinturas, usualmente ocurre en niños menores de 3 años, puesto que éstos tienen la tendencia a comer las superficies escarapeladas de las paredes (síndrome de pica). La evidencia de la exposición al plomo en estos niños, se demostró por la presencia del metal en la orina después de la administración de un agente quelante (la d-penicilamina) y no por la determinación directa del plomo en sangre. Se planteó entonces que el plomo debería estar almacenado posiblemente en huesos, dientes u otros órganos, y por eso no se encontraba en cantidades detectables en la sangre (David, 1972; Piomelli et al., 1984).

La hiperactividad que se manifiesta en la intoxicación por plomo ha sido estudiada con detenimiento y se distingue por una actividad motora elevada de carácter compulsivo (Laufer y Denhoff, 1957; David et al., 1972). Wender (1971) describe la hiperactividad como "una disfunción en las actividades motoras y coordinadoras, en la atención y las funciones cognoscitivas, en el control del impulso, en las relaciones interpersonales y en la emotividad".

A todas las formas de hiperactividad se les ha llamado "disfunción cerebral mínima" (DCM). El término engloba un grupo heterogéneo de problemas motores que presentan los niños, asociados con otras deficiencias mentales, físicas y conductuales (Conners, 1972; Eisenberg, 1972; Kalverboer, 1978). Por lo tanto, es preciso aclarar a cuál tipo de hiperactividad corresponde la encontrada en niños expuestos a niveles bajos de plomo.

La hiperactividad se ha clasificado en tres grupos en base a su respuesta a fármacos y a sus síntomas asociados (Conners, 1971; Pyck y Baines, 1978; Weiss y Hechtman, 1979). En primer lugar, hay una hiperactividad asociada a episodios epilépticos y otros estados convulsivos como epilepsia psicomotora o del lóbulo temporal (límbica) (Margerison et al., 1966; Glaser, 1967). Los anticonvulsionantes difenilhidantoina y fenobarbital son prescritos con frecuencia para

controlar los episodios hiperactivos asociados a estados convulsivos (Plaa y Hine, 1960; Buchthal y Svensmark, 1971).

En el segundo grupo de la clasificación se encuentra la hiperactividad asociada a otras patologías que tienen causa orgánica obvia. Por ejemplo, hipoxia fetal, daño cerebral en la primera infancia, problemas genéticos tales como el síndrome de Down y otras enfermedades que ocasionan retardo mental (David et al., 1972; Shaffer, 1978). Con regularidad se observa un electroencefalograma (EEG) anormal y patognomónico de estos casos (Satterfield et al., 1973).

Por último, el tercer tipo de hiperactividad que presentan los niños que no tienen daño neurológico, ni enfermedad asociada o causa conocida, pero que tienen antecedentes de exposición crónica al plomo, se distingue por su respuesta paradójica a las drogas que actúan sobre el SNC, como la d-anfetamina, metilfenidato y fenobarbital (Conners, 1971; Millichap, 1973). Se sabe que la d-anfetamina y el metilfenidato producen hiperactividad y compulsividad en las personas y animales normales a los que se administran (Weiss y Laties, 1962; Randrup y Munkvad, 1966; Knights y Hinton, 1969; Thornburg y Moore, 1973; Sahakian et al., 1975; Creese e Iversen, 1975; Rapoport et al., 1978). Sin embargo, estos fármacos originan un efecto contrario en los niños hiperactivos a consecuencia de la exposición prolongada al plomo; ésto es, disminuyen su

hiperactividad y compulsividad (Arnold et al., 1972; Millichap, 1973; Silbergeld y Goldberg, 1975; Sahakian y Robbins, 1977). Por el contrario, el fenobarbital, que muchas veces seda a los niños normales (Blair, 1980), aumenta la hiperactividad de los niños con problemas de intoxicación por dicho metal (Wender, 1971; Erenberg, 1972).

La disminución en el aprendizaje es otro de los síndromes ocasionados por la exposición prolongada a dosis bajas de plomo desde edades tempranas del desarrollo. Needleman (1980) encontró que los niños que tenían un alto contenido de plomo en la dentina, comparados con los que lo tenían bajo, obtuvieron menor calificación en una serie de pruebas psicológicas especiales para evaluar su aprendizaje y retención; y pudo establecer una gran correlación entre los intervalos de calificaciones obtenidos por estas pruebas, con los niveles de plomo encontrados en sus dientes. Otros investigadores, también han reportado disminución en el coeficiente intelectual (IQ) y problemas al ejecutar tareas específicas en niños intoxicados (Laufer y Denhoff, 1957; De la Burde y Choate, 1972). Sin embargo, en los países del Tercer Mundo, la correlación entre las deficiencias del aprendizaje e intoxicación por plomo es más difícil de establecer debido a la multiplicidad de las causas que ocasionan el síndrome (Sheffer et al., 1981); por citar alguna, se mencionará la desnutrición (Cravioto y DeLicardie, 1973; McKay, et al., 1974; López et al., 1985). No obstante,

hay estudios en estos países que pretenden establecer la relación causa-efecto entre la intoxicación por el plomo y la deficiencia del aprendizaje (Silbergeld y Chisolm, 1976; David et al., 1972; Baker et al., 1985). En México, Harmony ha estudiado el EEG de niños que habitan en áreas marginadas y sospechosas de contener niveles altos de plomo. Las alteraciones electroencefalográficas que ha encontrado en niños con rendimiento escolar deficiente y que no se presentan en los niños control (niños con aprendizaje normal y residentes en áreas no contaminadas de la misma población) se las atribuyó a la presencia de niveles elevados del metal en sus organismos, ya que no se pueden explicar por ninguna otra alteración orgánica (Baker et al., 1985).

### 3. BASES NEUROQUIMICAS DE LA INTOXICACION

Se conoce muy poco de las alteraciones neuroquímicas y neurofisiológicas que generan las manifestaciones de la toxicidad crónica por plomo, pues el cerebro humano no es un tejido accesible para estudios experimentales, y los marcadores bioquímicos disponibles periféricamente reflejan muchos procesos metabólicos, además de los del SNC (Winder y Kitchen, 1984; Shellenberger, 1984). Por éso el esclarecimiento de los mecanismos moleculares de la toxicidad del plomo depende del uso de animales de experimentación. En un intento por correlacionar las alteraciones conductuales

y farmacológicas con las modificaciones en el metabolismo de neurotransmisores específicos, ya se han logrado reproducir en modelos animales la hiperactividad, el tremor, la conducta estereotipada (Silbergeld y Goldberg, 1973, 1974, 1975) y la respuesta paradójica a la d-anfetamina (Silbergeld y Goldberg, 1973; Shih y Hanin, 1977; Kostas et al., 1978; Memo et al., 1980). Tres sistemas de neurotransmisores se han estudiado en detalle: colinérgico, catecolaminérgico y GABA-érgico, aunque recientemente se ha iniciado el estudio de los sistemas serotoninérgico (Dubas y Dina, 1978; Dubas et al., 1978; Lasley et al., 1984) y peptidérgico (Govoni et al., 1980; Winder et al., 1984).

#### 4. LA TRASMISION COLINERGICA EN LA INTOXICACION

El efecto del plomo sobre la neurotransmisión colinérgica se ha estudiado debido a la neuropatía periférica que ocasiona dicho metal y que se expresa en la persona adulta como una debilidad muscular de los extensores de los dedos y de la muñeca (Catton et al., 1970; Baker et al., 1984), similar a la parálisis del nervio radial. En los niños, la polineuritis tiende a ser más generalizada (Seto y Freeman, 1964; Merrit, 1975). Algunos investigadores han demostrado, utilizando la preparación del ganglio simpático de rata y gato, que el plomo in vitro, disminuye la liberación de acetilcolina provocada por la estimulación de la fibra preganglionar (Kostial y Vouk, 1957) y otros, usando

la preparación de la placa muscular de la rana (Manalis y Cooper, 1973; Kober y Cooper, 1976; Cooper et al., 1984; Manalis et al., 1984) o de la rata (Atchison y Narahashi, 1984; Pickett y Bornstein, 1984), también han observado una disminución en la liberación provocada de acetilcolina del elemento presináptico. Estudios más finos referentes al efecto del plomo in vitro sobre la liberación espontánea del neurotransmisor y la causada por estimulación nerviosa, fueron realizados por Atchison y Narahashi (1984). Estos autores encontraron que cuando se exponía la preparación neuromuscular a 20 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pb}^{++}$  se deprimía la amplitud del potencial de placa terminal (EPP), sin que se afectara la amplitud de los potenciales miniatura (MEPP). Este efecto era revertido cuando se aumentaba la concentración de calcio extracelular o cuando se removía el plomo de la preparación. Además, encontraron que el contenido cuántico medio (m) se reducía en forma significativa por el tratamiento con dicho metal sin que variara la probabilidad de la liberación del neurotransmisor (p).

Los efectos del plomo sobre la función colinérgica del SNC son inciertos y algunos, hasta contrarios. Esto puede deberse a la multiplicidad de procesos (recaptura, liberación, síntesis, recambio, etc.) que se han estudiado, a la diversidad de áreas anatómicas del SNC en las que se han estudiado dichos parámetros, y a la desigualdad de esquemas de tratamiento y animales de experimentación usados

(Winder y Kitchen, 1984).

##### 5. EL SISTEMA GABAÉRGICO EN LA INTOXICACION

El sistema GABAérgico es otro sistema neuronal que puede ser afectado por el plomo. Se ha demostrado por estudios in vivo, que la recaptura de alta afinidad del GABA y su liberación estimulada por despolarizaciones inducidas por potasio se encuentran inhibidas en sinaptosomas de todas las áreas del SNC estudiadas, excepto en cerebelo (Gerber et al., 1978). Sin embargo, las actividades enzimáticas de la GABA descarboxilasa (GAD) y de la GABA transaminasa (GAT) no se encuentran afectadas, salvo en el núcleo caudado donde la actividad de la GAD está aumentada, y en la corteza cerebral donde la actividad de la GAT está disminuida (Silbergeld et al., 1979; Silbergeld y Hruska, 1980; Silbergeld y Lamon, 1980). Por otra parte, tampoco los niveles endógenos de GABA se han encontrado alterados en el SNC (Golter y Michaelson, 1975; Piepho et al., 1976).

Es difícil explicar las consecuencias de estos cambios, ya que el GABA es el neurotransmisor inhibitor más abundante del SNC y su interacción con otros sistemas neuronales es compleja (Nistri y Constanti, 1979). Sin embargo, una posible interpretación sería que, debido a la inhibición de la transmisión GABAérgica ocasionada por el plomo (Winder y Kitchen, 1984), se presentara un aumento en la

excitabilidad del SNC. Otra opción la proporciona la alteración de la biosíntesis del grupo Hem que ocasiona un aumento en el ácido d-aminolebulinico (ALA) (Moore y Meredith, 1976; Roels et al., 1976; Chisolm Jr., 1978; Piomelli, 1980; Piomelli et al., 1982). Se sabe que el ALA es un desplazador débil de la unión del GABA a receptores de membrana (Gerber et al., 1978) y que también inhibe la liberación de GABA de sinaptosomas (Brennan y Cantrilli, 1979). Por eso, Silbergeld y Lamon (1980) han sugerido que la neurotoxicidad del plomo pueda deberse, en parte, a la interacción del ALA sobre los receptores GABAérgicos y a la disminución en la liberación del GABA.

#### 6. EL SISTEMA CATECOLAMINERGICO EN LA INTOXICACION

El estudio del metabolismo y la transmisión del sistema catecolaminérgico en animales intoxicados en forma crónica ha sido motivado por el afán de correlacionar la hiperactividad, la conducta estereotipada y la respuesta paradójica a la d-anfetamina y al metilfenidato que aparecen en este caso, con cambios en el metabolismo de las catecolaminas (Arnold et al., 1972; Silbergeld y Goldberg, 1973; Sauerhoff y Michaelson, 1973; Golter y Michaelson, 1975) muy especialmente con el metabolismo del sistema dopaminérgico del núcleo caudado y del accumbens (Govoni et al., 1980; Jason y Kellogg, 1981; Memo et al., 1981; Lasley et al., 1984, 1985; Minnema et al., 1986), pues la concentración más

alta de plomo en el cerebro se encuentra en los ganglios basales y en la sustancia gris (Task group, 1973).

Ya se explicó en que consistían la respuesta paradójica y la hiperactividad; ahora es necesario definir la conducta estereotipada que presenta la rata. Esta conducta se distingue en que el animal está en continuo acicalamiento, tiene movimientos repetidos de la cabeza y miembros anteriores, olfatea incesantemente, mordisquea y roe en una forma compulsiva (Sahakian et al., 1975; Sahakian y Robbins, 1977; Ljungberg y Ungerstedt, 1985). Se ha considerado que el aumento del metabolismo del sistema dopaminérgico nigroestriatal sea el origen de la conducta estereotipada. Este concepto está fundamentado por el hecho de que la aplicación de dopamina en el estriado, o la administración de apomorfinas, agonistas dopaminérgicos (Ljungberg y Ungerstedt, 1978), o de d-anfetamina, fármaco que aumenta la transmisión dopaminérgica en el neostriado (Fog et al., 1967; Creese e Iversen, 1974), producen la conducta estereotipada. Y por el contrario, la destrucción de las vías dopaminérgicas nigroestriatales por 6-hidroxidopamina (6-HODA) (Naylor y Olley, 1972; Fibiger et al., 1973); o la administración de antagonistas dopaminérgicos típicos como el haloperidol (Ljungberg y Ungerstedt, 1985), bloquean la conducta estereotipada inducida por la d-anfetamina. Además se ha postulado que el neostriado también está involucrado en el control de los movimientos (Star et al., 1983).

Es ya conocido que la lesión unilateral de la sustancia nigra de la rata produce un desequilibrio en la transmisión dopaminérgica en el estriado; de tal forma que cuando se estimula la transmisión farmacológicamente o con maniobras que producen tensión en los animales se presenta la conducta de giro. Hay que recordar que la tensión y la administración de d-anfetamina producen giro hacia el lado lesionado, y la apomorfinina ocasiona giro contralateral a la lesión (Ungerstedt, 1971; PycocK, 1980; Gershanik et al., 1982; Jackson y Kelly, 1983). Es preciso señalar que este diseño experimental se implementó como un modelo para estudiar la enfermedad de Parkinson que es debida a una deficiencia en el metabolismo del sistema dopaminérgico nigroestriatal (Hornykiewicz, 1966; Bernheimer et al., 1973; Forno y Alvord, 1974; Yamaguchi et al., 1983).

Hay también fuertes evidencias que apoyan la participación del núcleo accumbens en la conducta motora. La posibilidad de que este sistema dopaminérgico mesolímbico medie la actividad motora inducida por d-anfetamina, es reforzada por el hecho de que la microinyección bilateral de dopamina en los núcleos accumbens (Pijnenburg y Van Rossum, 1973; Jackson et al., 1975) y la administración sistémica de apomorfinina, (Ljungberg y Ungerstedt, 1978), causan hipermovilidad en los animales. Por el contrario, la destrucción del sistema dopaminérgico mesolímbico con 6-HODA

(Kelly e Iversen, 1976) y la aplicación de antagonistas dopaminérgicos típicos en el accumbens (Pijnenburg et al., 1975) inhiben el aumento de locomoción inducido por la d-anfetamina; asimismo, la administración sistémica de antidopaminérgicos del tipo de sulpiride, clozapina y tioridazina bloquean la hiperactividad que causa la inyección de dopamina en accumbens (Costall y Naylor, 1976).

En el modelo de intoxicación crónica por plomo, puede decirse que se han estudiado todos los elementos del metabolismo del sistema dopaminérgico, desde el contenido endógeno de dopamina y sus catabolitos, hasta sus estadios más dinámicos como síntesis, recambio y liberación (Shellenberger, 1984; Winder y Kitchen, 1984). Aunque los resultados obtenidos en relación con los aspectos citados no han sido concluyentes por su discrepancia (Winder y Kitchen, 1984), y a pesar de que el mecanismo por el cual el plomo afecta al funcionamiento dopaminérgico permanece en especulación (Shellenberger, 1984), los hallazgos más recientes señalan que el metabolismo dopaminérgico se encuentra incrementado por el efecto del plomo. Minnema et al., (1986) encontraron que la administración de plomo (3 y 10  $\mu\text{M}$ ) in vitro, aumentaba la liberación basal de dopamina de sinaptosomas del estriado, en una forma dosis-dependiente. Este efecto se ve amplificado cuando se remueve el calcio del medio de perfusión. Además, el plomo disminuyó la liberación de dopamina provocada por estimulación con

altas concentraciones de potasio (61 mM). En estudios in vivo, también se ha encontrado que el plomo administrado en forma constante desde el nacimiento, aumenta la síntesis de dopamina en el núcleo accumbens y en el estriado. Este hecho solo se manifiesta cuando se estimula la actividad dopaminérgica con la administración de d-anfetamina (Lasley et al., 1985).

## 7. LAS BIOPTERINAS EN LA INTOXICACION

A últimas fechas se ha iniciado el estudio de otros elementos del sistema dopaminérgico en relación a la intoxicación crónica por plomo: las biopterinas.

El término "biopterina" engloba un conjunto de compuestos que tienen en común la estructura 2-amino-4-hidroxipteridina y que pueden existir en sus formas tetrahidro, dihidro o completamente oxidadas. Las biopterinas, la molibdopterina y la pterina son conocidas como pteridinas no conjugadas en tanto que el folato se conoce como pteridina conjugada; ésto se debe a la unión del p-aminobenzilglutamato a la pteridina (Nichol et al., 1985). (Fig. 2).

La tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) es el cofactor esencial de una familia de hidroxilasas de aminoácidos aromáticos dependientes de pterina (Kaufman, 1963). De las tres

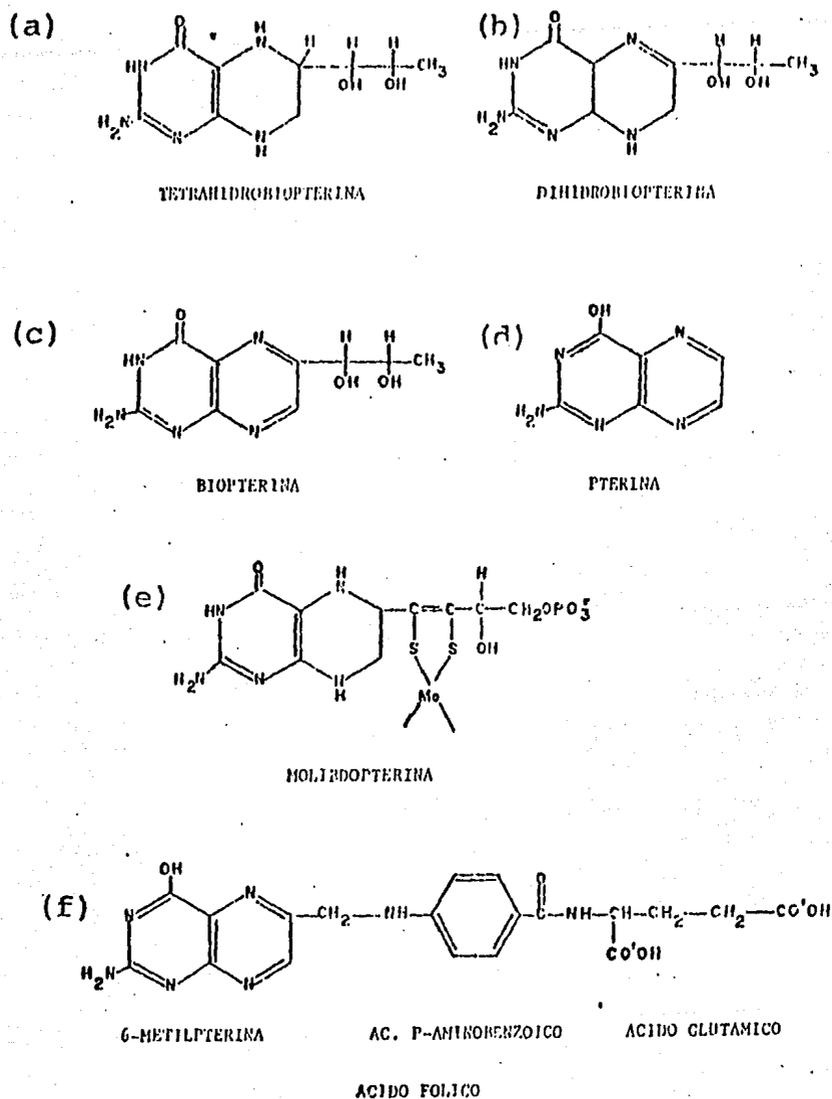
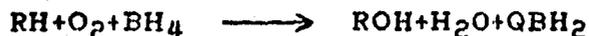


Figura 2. Las estructuras químicas de las pteridinas no conjugadas (a, b, c, d y e) y conjugada (f). La familia de las biopterinas se forma por a, b y c.

hidroxilasas pterina-dependientes (fenilalaninahidroxilasa (FAH), tirosinahidroxilasa (TH) y triptofano-5-hidroxilasa (T5H)), las dos últimas enzimas catalizan el paso limitante de la biosíntesis de las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina) e indolaminas (serotonina y melatonina), respectivamente (Hosoda y Glick, 1966; Nagatsu *et al.*, 1972; Nagatsu, 1981). (Fig. 3). La reacción general que cataliza cualquiera de las hidroxilasas como la fenilalanina hidroxilasa, es la siguiente:



Donde RH corresponde a fenilalanina,  $BH_4$  a tetrahidrobiopterina, ROH a tirosina y  $QBH_2$  al quinonoide dihidrobiopterina.

El  $QBH_2$  puede sufrir una tautomerización espontánea y transformarse a dihidrobiopterina ( $BH_2$ ), la que se considera un catabolito (Kaufman, 1964), o por medio de la quinonoide dihidrobiopterin reductasa (QPR) dependiente de NADPH, puede reducirse a  $BH_4$ . La reacción que cataliza la QPR, es la siguiente:



Esta reacción se conoce como "vía de salvamento o recuperación" (Nielsen *et al.*, 1969; Scrimgeour & Cheema, 1971;

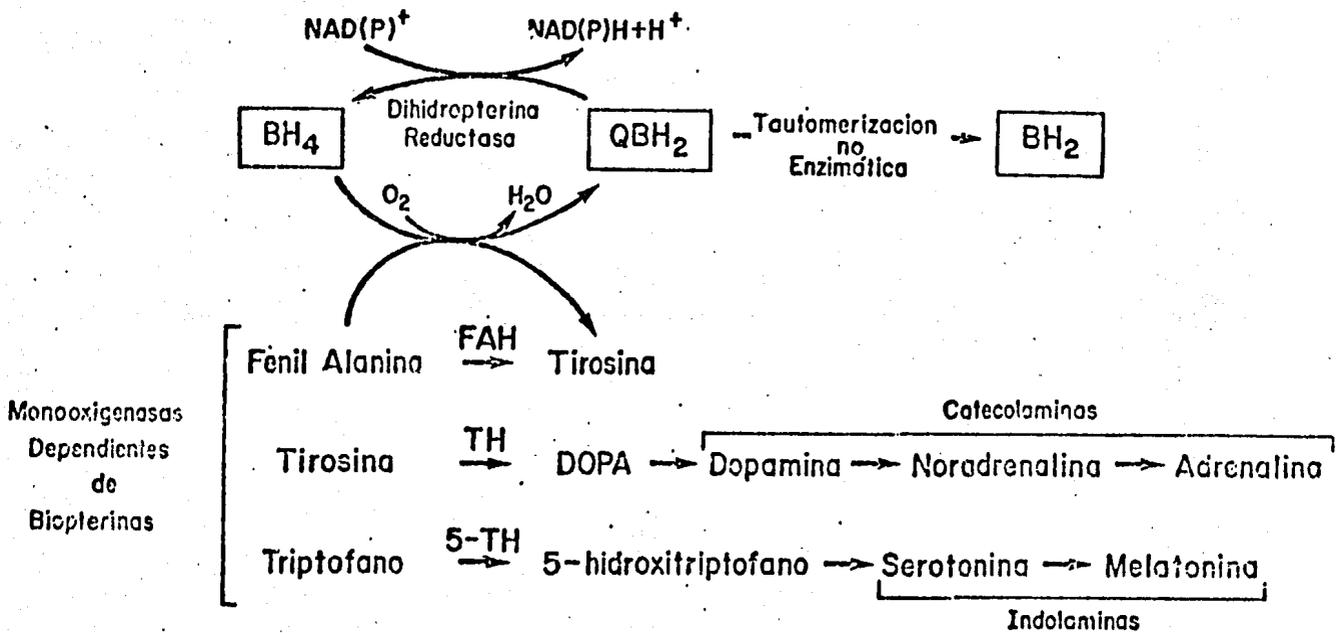


Figura 3. Metabolismo de las biopterinas y su utilización como cofactores en la biosíntesis de las aminas biogénicas y la tirosina ( $\text{BH}_2$ =dihidrobiopterina, FAH=fenilalanina hidroxilasa, TH=tirosina hidroxilasa y 5-TH=tirosina hidroxilasa).

Craine et al., 1972).

La biosíntesis de  $BH_4$  que se ha propuesto en el tejido nervioso, se resume en la fig. 4 (Kapatos et al., 1982). El precursor es el guanosin-5'-trifosfato (GTP) que se convierte a 7,8-dihidroneopterina trifosfato ( $NPTH_2-P_3$ ) por la acción de las GTP ciclohidrolasas I y II (Gal et al., 1978; Gal, 1982). La  $NPTH_2P_3$  se convierte a 6-(1,2-dioxopropil)-7,8-dihidropterina (DODP) por la enzima  $A_2$ , dependiente de  $Mg^{++}$  (Eto et al., 1976; Tanaka et al., 1981). Este compuesto es reducido por NADPH y una enzima designada  $A_1$  (Tanaka et al., 1981) para producir la 6-lactil-7,8-dihidropterina (sepiapterina). La sepiapterina es reducida por la sepiapterinreductasa dependiente de NADPH para transformarse en la 7,8-dihidrobiopterina ( $BH_2$ ) (Kapatos et al., 1981; Kapatos et al., 1982). Finalmente, la  $BH_2$  de esta vía biosintética, se transforma a  $BH_4$  por acción de la folato reductasa (Gal, 1982).

Leeming et al. (1981) han encontrado alteraciones en los niveles plasmáticos de las biopterinas en personas intoxicadas con plomo. En pacientes intoxicados con altas dosis, observó una disminución en la concentración plasmática de las biopterinas (Leeming y Blair, 1980); por el contrario, en personas intoxicadas con cantidades bajas del metal, los niveles de biopterina eran altos (Purdy et al., 1981).

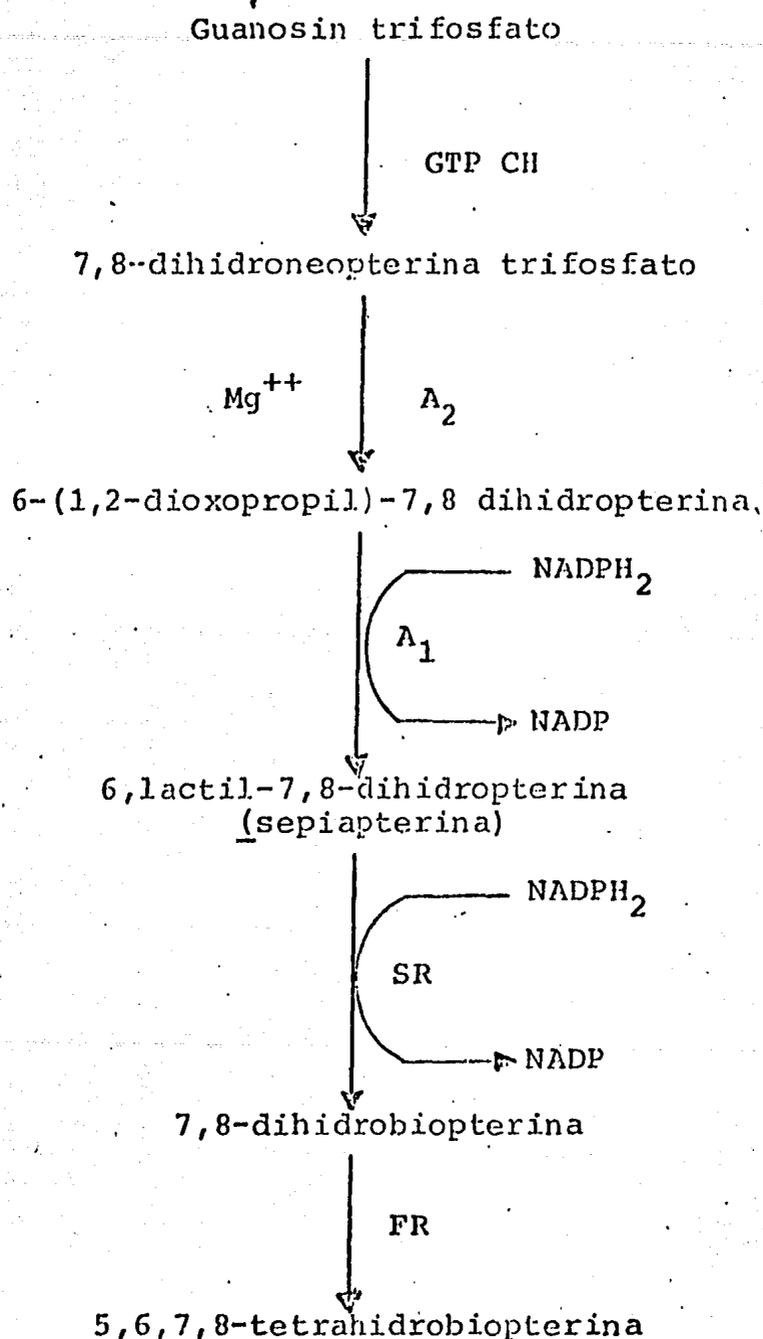


Fig. 4. Biosíntesis de la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) en el tejido nervioso. GTP CH (GTP ciclohidrolasa) SR (Sepiapterin reductasa); FR (Folato reductasa). La descripción se detalla en el texto.

Para explicar estas alteraciones y basándose en los hallazgos que explican otros padecimientos del sistema de las biopterinas (como la deficiencia congénita de la GTP-CH que provoca una disminución de los niveles plasmáticos de biopterinas y la deficiencia de la QPR que produce un aumento de  $BH_2$  en orina), Leeming et al. (1981) postularon que en una intoxicación crónica con niveles de plomo elevados, el metal puede inhibir la vía de síntesis de la  $BH_4$ ; ésto traería como consecuencia una disminución de todos los metabolitos intermediarios de las biopterinas lo que se reflejaría en la disminución de los niveles plasmáticos de  $BH_2$  (ver fig. 5). Por el contrario, en el caso de la intoxicación con bajas dosis de plomo, puede ocurrir una inhibición de la QPR por el metal. Esto acarrearía una incapacidad para recuperar  $QBH_2$  que pasaría inmediatamente a su forma oxidada estable ( $BH_2$ ) y que, al eliminarse del tejido nervioso en concentraciones mayores, incrementaría los niveles plasmáticos de biopterinas (ver fig. 6).

Hay que tener en cuenta que las hipótesis de Leeming et al. (1981), han sido fundamentadas por cambios en los niveles plasmáticos y urinarios de las biopterinas observados en humanos, lo que limita la aplicación de diseños experimentales dirigidos a aclarar los mecanismos moleculares. Por lo tanto, mientras no se tenga acceso a estudiar directamente el efecto de la intoxicación sobre los tejidos afectados, principalmente el nervioso, pueden

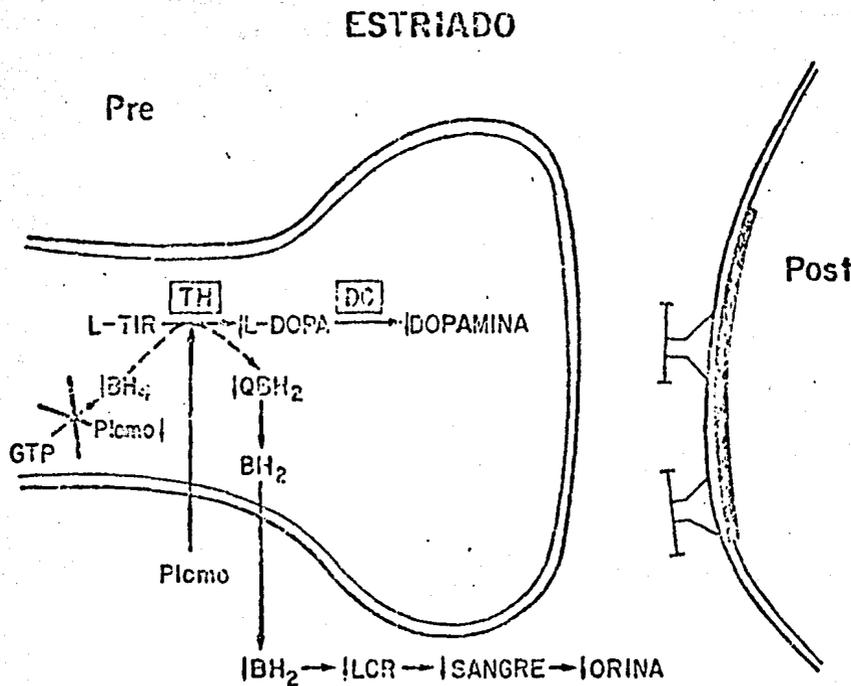


Figura 5. Esquema de una sinápsis dopaminérgica del estriado en el que se ilustra la acción del plomo a dosis altas, según la hipótesis de Leeming et al. (1981). En este caso, postula que el plomo inhibiría la síntesis de la  $BH_4$ ; esto resultaría en una disminución de todos los metabolitos de la  $BH_4$ . Por lo tanto, la  $BH_2$  se eliminaría en menores cantidades del tejido nervioso a LCR, sangre y orina.

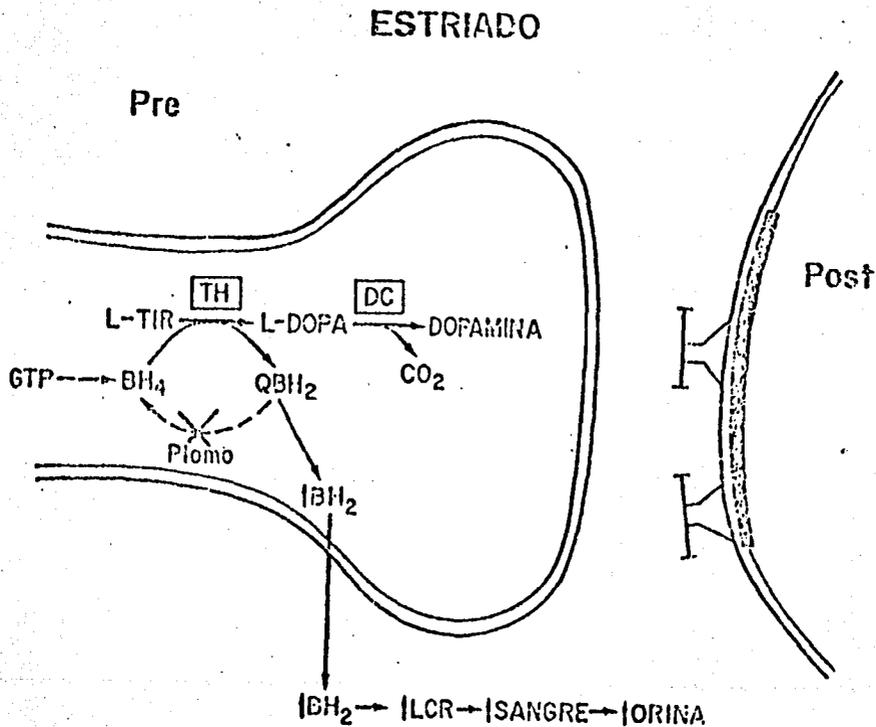


Figura 6. Esquema de una sinápsis dopaminérgica del estriado en el que se ilustra la acción del plomo a dosis bajas, según la hipótesis de Leeming et al. (1981). El postula que el  $Pb^{++}$  inhibiría a la QPR, entonces el  $QBH_2$  se transformaría en mayor cantidad a su forma estable,  $BH_2$  que, al eliminarse del tejido nervioso aumentaría sus niveles en líquido cefalo-raquídeo, sangre y orina.

considerarse muchas explicaciones alternativas. Para ilustrar este hecho, se mencionarán las siguientes teorías, diferentes a las de Leeming y que explican los mismos hallazgos: por ejemplo, el incremento de la concentración plasmática de la  $BH_2$  en el caso de la intoxicación leve que él explica por una inhibición en la QPR (fig. 6), no excluye la posibilidad de una estimulación en la actividad de la QPR acompañada de una mayor utilización del cofactor por la TH (fig. 7). Asimismo, el efecto de la intoxicación crónica más severa sobre los niveles plasmáticos de las biopterinas podría explicarse por una inhibición de la TH sin que estuviera afectada la vía sintética de las biopterinas como Leeming propone, ya que si no se utiliza el cofactor no habría catabolito,  $BH_2$ , ni en líquido cefalorraquídeo (LCR), ni en plasma, ni en orina (ver fig. 8). Como se puede observar, faltan estudios en modelos animales que permitan aclarar los mecanismos moleculares de la acción del plomo, muy especialmente en el metabolismo de las biopterinas.

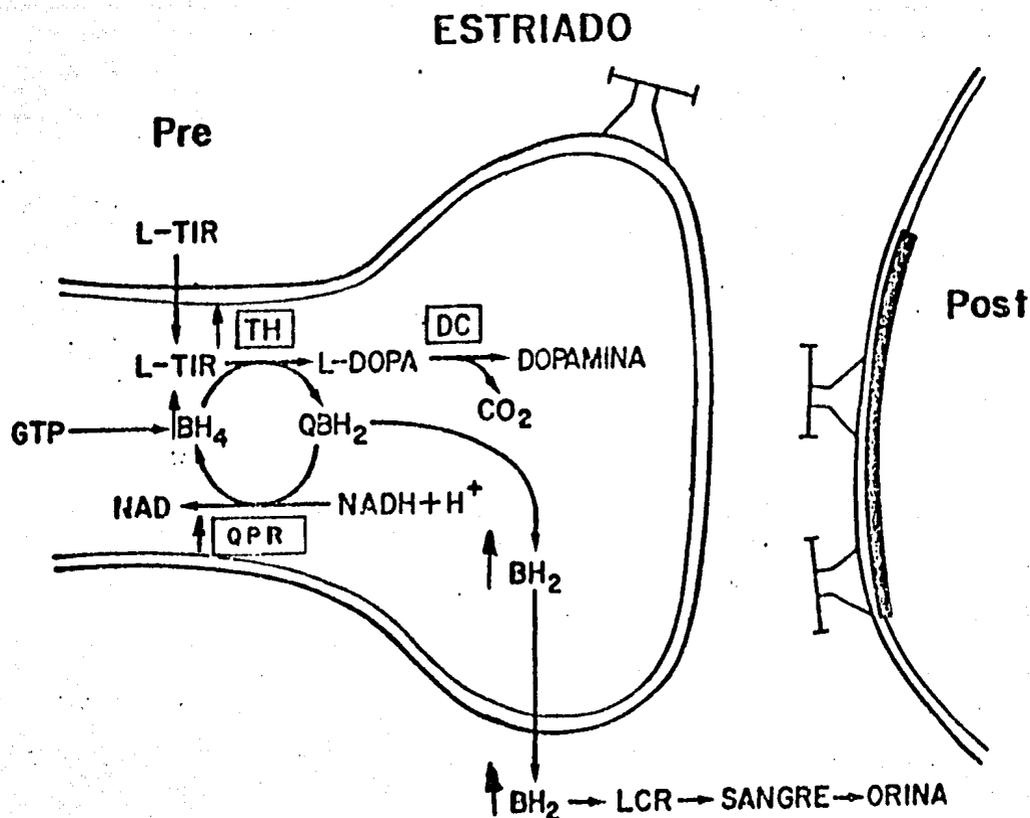


Figura 7. Esquema de una sinápsis dopaminérgica del núcleo caudado donde se ilustra otra posible acción del plomo en la intoxicación crónica a dosis bajas, alternativa a la propuesta por Leeming et al. (1981). En este caso, el plomo estaría estimulando la actividad de la QPR. El consecuente incremento en la concentración de la BH<sub>4</sub>, a su vez, estimularía la actividad de la TH; esto implica una mayor utilización del cofactor que necesariamente va a repercutir en un aumento en los niveles de su catabolito, BH<sub>2</sub>, en LCR, plasma y orina.

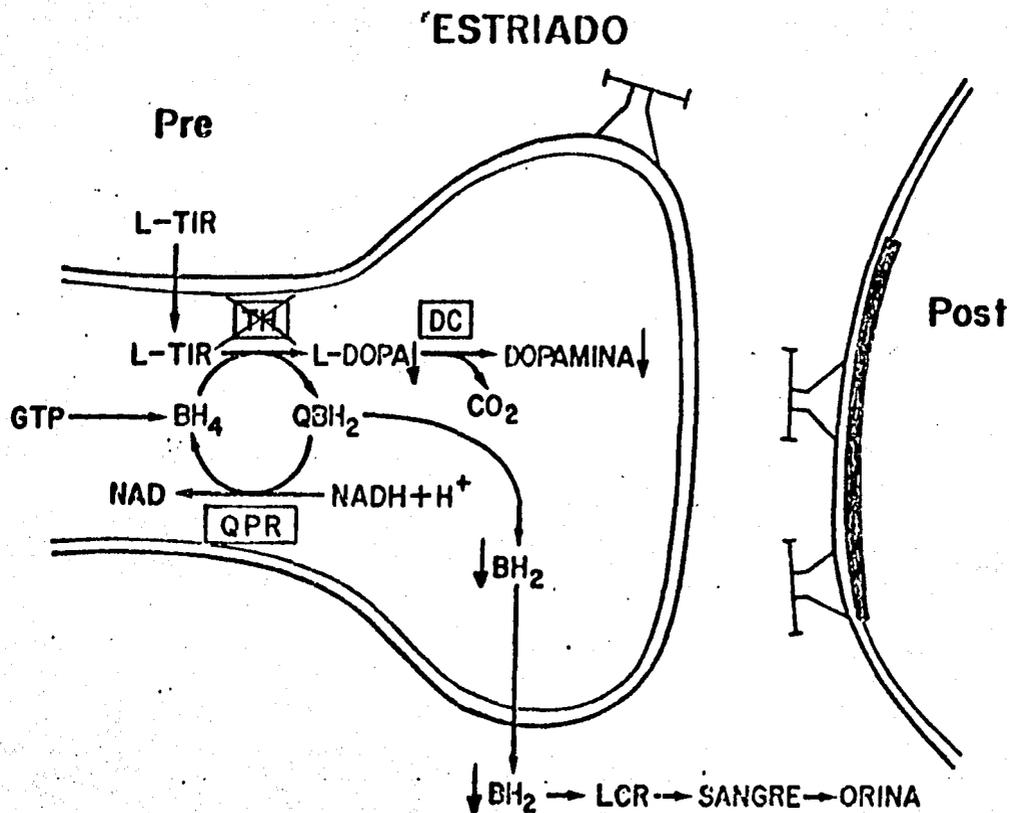


Figura 8. Esquema de una sinápsis dopaminérgica del núcleo caudado donde se ilustra otra posible acción del plomo en la intoxicación crónica más severa, alternativa a la propuesta por Leeming et al. (1981). En este caso, la inhibición de la TH puede explicar los niveles bajos de biopterinas encontrados tanto en humanos como en animales de experimentación, sin que se encuentre dañada la síntesis de la  $\text{BH}_4$ . Al no ser utilizado el cofactor habría una disminución de su catabolito en LCR, plasma y orina.

## HIPOTESIS DE TRABAJO

El propósito de esta tesis es investigar si la intoxicación crónica a dosis bajas de plomo afecta de alguna manera al paso enzimático limitante de la síntesis de la tetrahidrobiopterina, catalizado por la GTP-Ciclohidrolasa, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos.

## OBJETIVOS

10.- Montar la metodología más adecuada para medir la actividad de la GTP-CH.

20.- Utilizar dicha metodología para medir la actividad de la GTP-CH, en los animales intoxicados y controles.

30.- Determinar el efecto de la intoxicación sobre los niveles de biopterinas cerebrales (núcleo caudado), plasmáticas y urinarias.

## METODOLOGIA

### 1. INTOXICACION DE LOS ANIMALES.

El plomo se administró en el agua de beber en forma de acetato de plomo a una concentración de 2000 ppm (base libre). La intoxicación se inició dando la solución del metal a un lote de ratas hembra durante dos meses antes de la preñez, y se continuó durante la gestación y la lactancia. Después del destete, se prosiguió intoxicando a las crías macho hasta que alcanzaron los 250-300 grs. de peso, aproximadamente a los 3 meses de edad. Al cumplir esta edad los animales fueron sacrificados.

### 2. OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO.

Las ratas se sacrificaron por decapitación a una temperatura de 2-4 °C. Las cabezas se introdujeron 3 segundos en nitrógeno líquido para inactivar el sistema enzimático. Se disecaron los núcleos caudados haciendo un corte coronal a nivel del borde anterior del quiasma óptico. El tejido se conservó en hielo. Después de pesarlo se homogenizó en la solución amortiguadora tris HCl 0.1 M, conteniendo 1 mM de EDTA y 0.3 M de KCl (solución amortiguadora de incubación) conservando una relación de peso/volumen de 1:3.5. El pH de

la solución amortiguadora de incubación se varió de acuerdo con los requerimientos del ensayo. La homogenización se hizo en minihomogenizadores de cristal cuando los volúmenes eran muy pequeños, o en Polytron (Brynkmann) cuando los volúmenes excedían los 5 mls.

El homogenizado se centrifugó en una ultracentrifuga Airfuge (Beckmann) a 30 psi, durante 5 min. El sobrenadante se desaló en columnas de Sephadex G-25, con un lecho de 1.5 ml de resina, mediante una centrifugación a 800 x g, durante 3 min, de acuerdo al método descrito por Neal (1973). La desalación se efectuó para remover todos los productos endógenos relacionados con la síntesis de biopterinas y así evitar que alguno de ellos modificara la actividad de la GTP-CH. Al homogenizado desalado se le llama extracto enzimático.

### 3. ENSAYO ENZIMATICO.

#### 3.1. Actividad de la GTP-CH.

La actividad de la enzima se midió en base a la cantidad de neopterina sintetizada in vitro a partir de su precursor, el GTP según el Método de Kapatos et al., 1983.

Para ésto, se preincubaron alícuotas de 200  $\mu$ l del

extracto enzimático durante 30 min, a 37 °C. Al término de la preincubación se inició la reacción enzimática al agregar a cada muestra 50 µl de GTP 10 mM (concentración final 2 mM), resuspendido en la solución amortiguadora de incubación. Las muestras se incubaron en la oscuridad, a 37 °C, durante un tiempo donde la cinética es lineal para determinar la actividad específica o, a diferentes tiempos para determinar la cinética de la enzima. Al término de la incubación, se añadieron 75 µl de HCl 1 N a cada muestra, para terminar la reacción enzimática.

El producto enzimático resultante es la 7-8-dihidroneopterina trifosfato (NPTH<sub>2</sub>-P<sub>3</sub>). Esta se cuantificó en la forma de neopterina que es su estado oxidado y desfosfatado.

### 3.2. Oxidación de la NPTH<sub>2</sub>-P<sub>3</sub>.

La NPTH<sub>2</sub>-P<sub>3</sub>, recién sintetizada, se oxidó a neopterina 3-fosfato agregando 25 µl de solución iodada (1% I, 2% KI) y dejando las muestras a temperatura ambiente por 1 hora. Se detuvo la oxidación añadiendo 75 µl de la solución amortiguadora Tris HCl 2 M pH 8.0.

### 3.3. Desfosfatación de la neopterina 3 fosfato.

Las muestras oxidadas se incubaron con 0.5 mg de

fosfatasa alcalina previamente disuelta en 50  $\mu$ l de la solución amortiguadora de incubación por tubo. La reacción de desfosfatación se llevó a cabo en la oscuridad a 37 °C, por 60 min y se detuvo añadiendo 4 ml de HCl 0.1 N a cada muestra, a las que se agregaron en seguida 250  $\mu$ l de TCA 100% y 150  $\mu$ l de estándar interno (0.1  $\mu$ M). Las muestras se centrifugaron en centrífuga Sorval, rotor SM 24 a 6,000 rpm por 15 min. El sobrenadante se sometió a cromatografía preparativa de intercambio iónico y después se procesó por cromatografía analítica, usando HPLC, de fase reversa con detección fluorométrica.

#### 4. CUANTIFICACION DE PTERIDINAS.

4.1. Determinación de pteridinas en diferentes tejidos siguiendo el Método de Kapatos et al., 1982.

##### a) Tejido cerebral:

El tejido (núcleo caudado) se homogeniza en HCl 0.1N en una proporción peso:volúmen de 1:10. Se le agregan 14 ng del estándar interno (neopterina) para valorar el porcentaje de recuperación después de la cromatografía preparativa y liofilización. Luego, 2 ml del homogenizado se oxidan a temperatura ambiente con 0.12 ml de solución yodada ácida (1% I<sub>2</sub>, 2% KI, disueltos en HCl 0.1N, durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se detiene al reducir el

exceso de yodo por la adición de 0.12 ml de ácido ascórbico al 1%. Las muestras se centrifugan a 15,000 x g por 30 min en una centrifuga Sorval, rotor SM-24. El sobrenadante se somete a las cromatografías preparativa y analítica.

b) Plasma:

La sangre que se extrae de la rata decapitada, se recibe en tubos cónicos de centrifuga que contienen EDTA en una proporción 1:10 (volumen:volumen) y 30 ng de estándar interno (neopterina). Se añaden 0.25 ml de TCA 2N por ml de sangre. A continuación se oxidan en medio ácido con 0.25 ml de solución yodada (1% I<sub>2</sub>, 2% KI, diluidos 1:1 con TCA 0.4 N.) durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se detiene por la reducción del exceso del oxidante adicionando 0.125 ml de ácido ascórbico 1%. Las muestras se centrifugan a 15,000 x g por 30 min en centrifuga Sorval, rotor SM-24. El sobrenadante se somete, igualmente, a las cromatografías preparativa y analítica.

c) Orina:

La orina se recolecta en jaulas metabólicas durante 12 horas. A 250 µl de orina se le añade 1 µg de estándar interno (neopterina) y 28 µl de TCA 2N. Las muestras se oxidan incubándolas con 2.5 ml de solución yodada ácida (1%

I<sub>2</sub>, 2% KI, diluidos 1:1 con TCA 0.4 N.) durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se detiene por la reducción del exceso del oxidante al añadir 1.25 ml de ácido ascórbico 1%. Las muestras se centrifugan a 15,000 x g por 10 min en centrifuga Sorval, rotor SM-24. El sobrenadante se somete, igualmente, a las cromatografías preparativa y analítica.

#### 4.2. Cromatografía preparativa de intercambio iónico (CPII):

##### a) CPII para purificar las muestras.

Las muestras se pasaron por columnas Dowex 50-X4 (forma H<sup>+</sup>) de 0.7 x 5 cm de lecho, previamente equilibradas con H<sub>2</sub>O. En seguida se lavan con agua desionizada y se eluyen con 10 ml de NH<sub>4</sub>OH 1N.

##### b) CPII para concentrar las muestras.

El eluado alcalino obtenido como en el inciso a, se procesa en columnas Dowex AG 1 X 8 (forma acetato), de lecho 0.7 x 1 cm., previamente equilibradas con H<sub>2</sub>O. Después se lava con agua y se eluye con 3 ml de ácido acético 1N. El eluado se recibe en viales que se congelan con hielo seco y se liofilizan para continuar su procesamiento por HPLC.

#### 4.3. Cromatografía analítica (HPLC):

Las muestras liofilizadas se resuspenden en 600  $\mu$ l de HCl 0.005 N y se pasan por filtros de celulosa Rainin de 0.2  $\mu$ m, para luego procesarse por HPLC de fase reversa con detección fluorométrica.

La fase móvil, metanol al 5% filtrado y desgasificado, se pasó a un flujo de 1 ml/min. Las longitudes de onda de excitación/emisión del espectrofluorómetro, fueron 330-380/460-600 nm. Las señales cromatográficas de las muestras se miden en centímetros y se comparan con la altura de los picos de los estándares reales.

#### 5. CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

Se cuantificaron las proteínas del sobrenadante del homogenizado y del desalado por el método de Lowry et al. (1951) utilizando albúmina bovina (BSA) como estándar.

#### 6. PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos se procesaron de acuerdo con la siguiente ecuación:

A.R.E. =  $\frac{M}{S}$  [pg neopterin] /  $\frac{1}{\text{st real}}$

S

$\frac{L}{\text{mg prot}}$

mg prot

$\frac{1}{t \text{ reacción (hr)}}$

t reacción (hr)

$\frac{1}{0.253 \text{ pg/pmol}}$

0.253 pg/pmol

donde:

A.E.E. = Actividad enzimática específica (pmol/hr/mg prot).

M = Neopterina de la muestra/Biopterina de la muestra (cm).

S = Neopterina del estándar real/Biopterina del estándar real  
(cm).

mg prot = mg de proteína de la alícuota que se va a incubar.

t reacción (hr) = tiempo de reacción enzimática.

## RESULTADOS

### 1. Condiciones espectrofotométricas para cuantificar proteínas por el Método Lowry.

Se le determinó el espectro de absorbancia a una alícuota de una solución de albúmina bovina (40  $\mu$ gr/ml) disuelta en Tris HCl 0.1 N, pH 8.0, procesada por el Método de Lowry. En la figura 9 se muestra su espectro en el rango visible. Se puede observar que la longitud de onda óptima para medir proteínas procesadas según este método en las condiciones de la solución amortiguadora del extracto enzimático desalado, fue de 750 nm. Todas las medidas espectrofotométricas se hicieron en esta longitud de onda.

### 2. Eficiencia de la cromatografía de exclusión para desalar.

Para determinar la eficiencia de las columnas de Sephadex G-25 se midió la concentración de proteína en el sobrenadante del homogenizado de los núcleos caudados antes, y después de someterse a cromatografía de exclusión, como se indicó en la metodología.

En la tabla 1 puede apreciarse que la recuperación de proteína de las columnas fue de un 93 %.

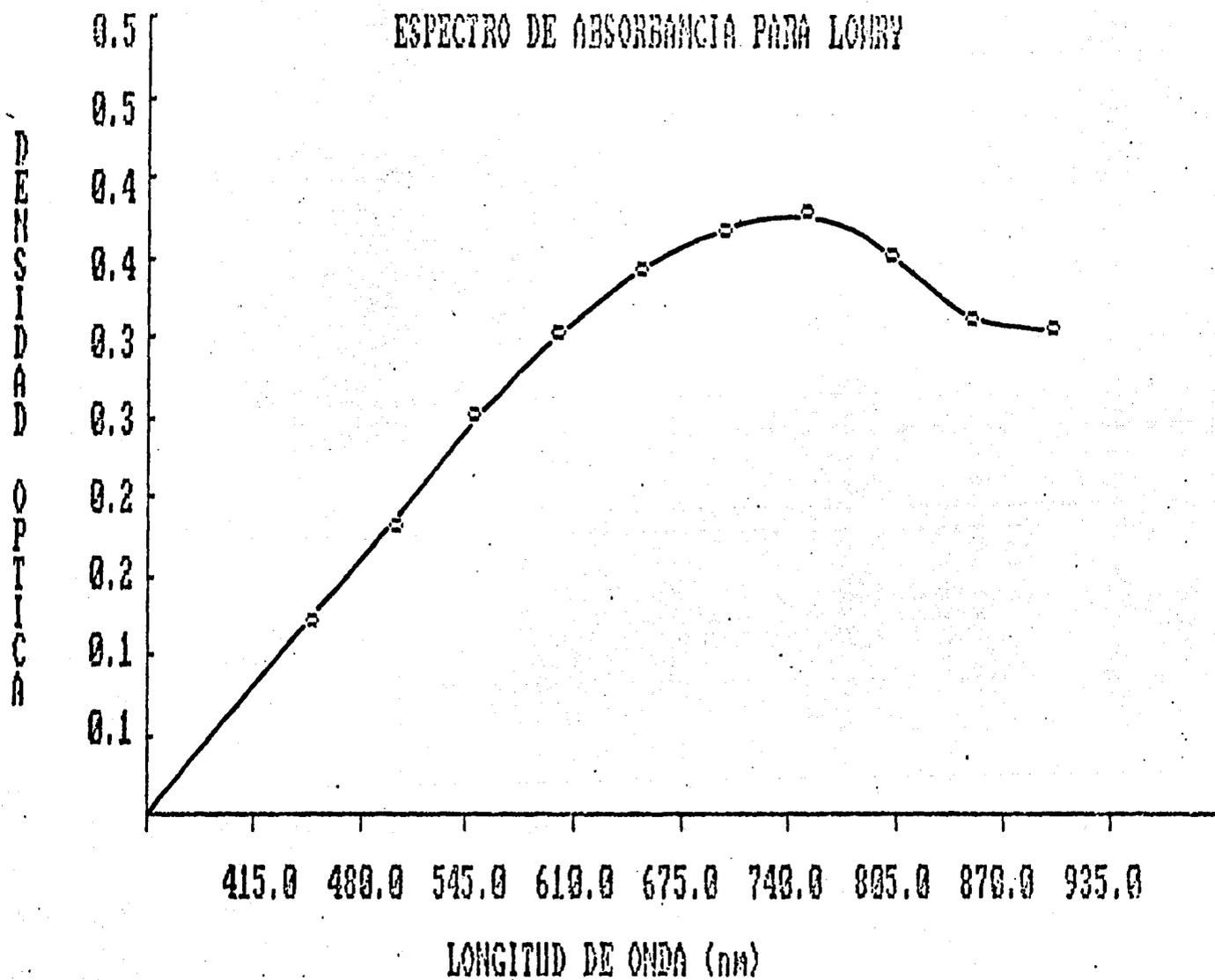


Figura 9. Espectro de absorbancia para una alícuota de BSA resuspendida en Tris HCl 0.1 N pH 8.0 procesada por el método de Lowry.

Tabla 1. Eficiencia de las columnas de Sephadex G25 que se utilizaron para desalar.

mg prot/ml		%
Sobrenadante	Desalado	Recuperación
9.8 ± 0.7	9.1 ± 0.4	93 ± 3

Los valores representan el promedio ± la desviación estándar de 36 ensayos, cada uno por triplicado.

### 3. Selección del estándar interno para HPLC.

Con el propósito de conocer el tiempo de retención de la neopterina (producto de la reacción enzimática) y del 6MPH<sub>2</sub> (estandar interno), se procesó por HPLC una muestra que contenía las dos sustancias y, como se observa en la figura 10-a, sus respectivas señales aparecen a los 4 y 19 minutos.

En la figura 10-b se puede apreciar, que cuando se incuba el extracto enzimático de los núcleos caudados con GTP, solo se sintetiza la neopterina (4 min) y no aparecen los otros metabolitos intermedios de la BH<sub>4</sub>. Obsérvese que no hay señal de la biopterina, cuyo tiempo de retención es de 8 min, como se puede comprobar en la figura 11-a. Por esta

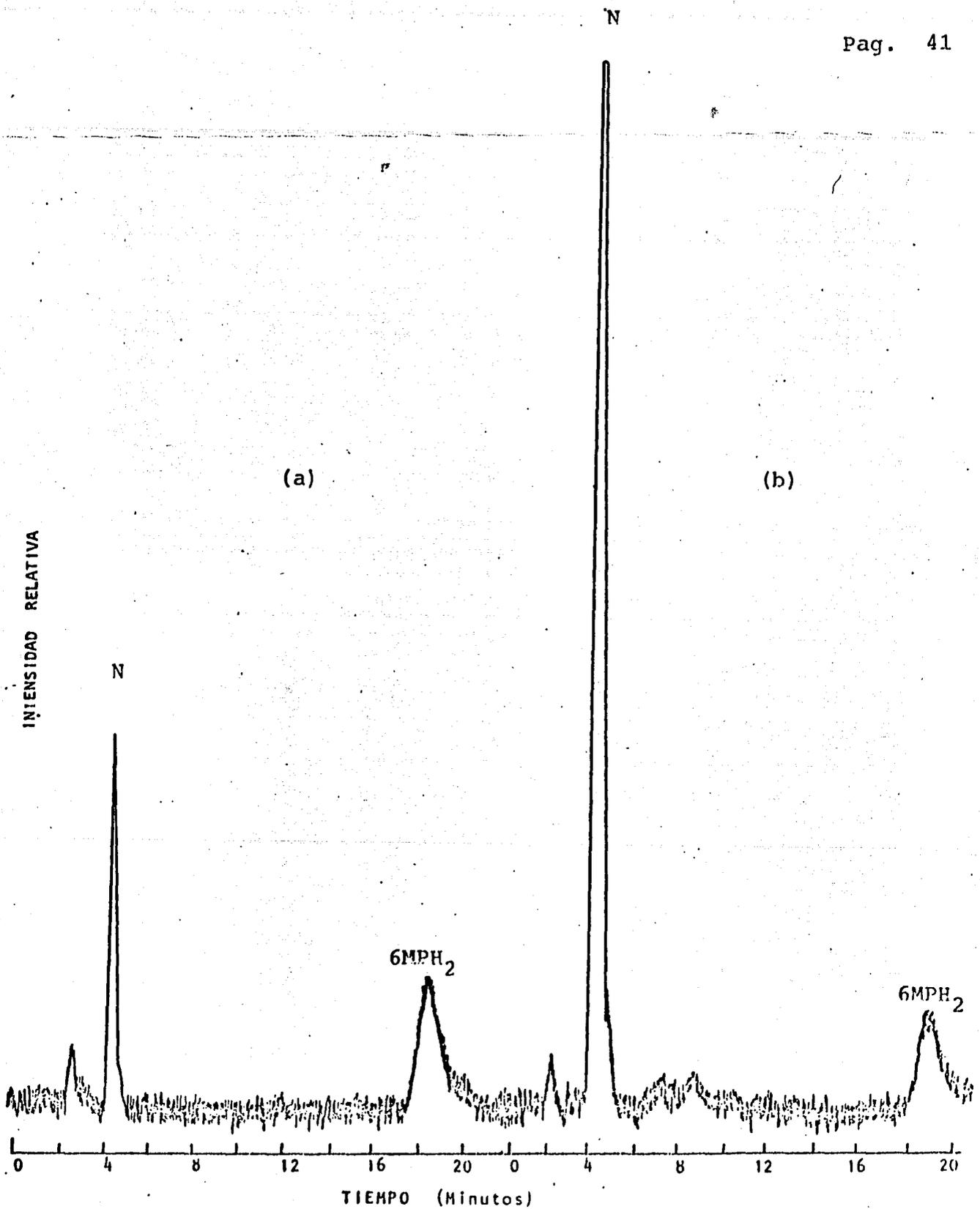


Figura 10. Cromatogramas en los que se observan los tiempos de retención de los estándares de Neopterina (4 min.) y de 6MPH<sub>2</sub> (18 min.), (a); y de Neopterina sintetizada por el extracto enzimático a partir de GTP, utilizando 6MPH<sub>2</sub> como estándar interno, (b).

razón, se decidió usar a la biopterina como estándar interno en lugar del 6MPH<sub>2</sub>, y así reducir la duración de la corrida cromatográfica.

#### 4. Caracterización del ensayo enzimático.

4.1. Demostración de que los elementos que intervienen en la reacción enzimática no interfieren en la determinación de la neopterina (producto de la reacción).

Se procesó por HPLC una alícuota del extracto enzimático desalado para observar su patrón cromatográfico. Como se puede ver en la figura 11-a no aparece ninguna señal que se interponga con la de la neopterina. Solo aparece la biopterina, estándar interno (tiempo de retención, 8 min.).

De este mismo modo, se procesó una alícuota de una solución de GTP 2 mM después de que se incubó en las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción enzimática pero en ausencia de las proteínas del extracto estriatal. El cromatograma de esta condición se puede observar en la figura 11-b. No aparece ninguna señal cromatográfica además del estándar interno, lo que indica que el GTP tampoco interfiere para la cuantificación de las biopterinas.

La figura 11-c muestra la señal de neopterina (4 min.) recién sintetizada por la GTP-CH del extracto estriatal a

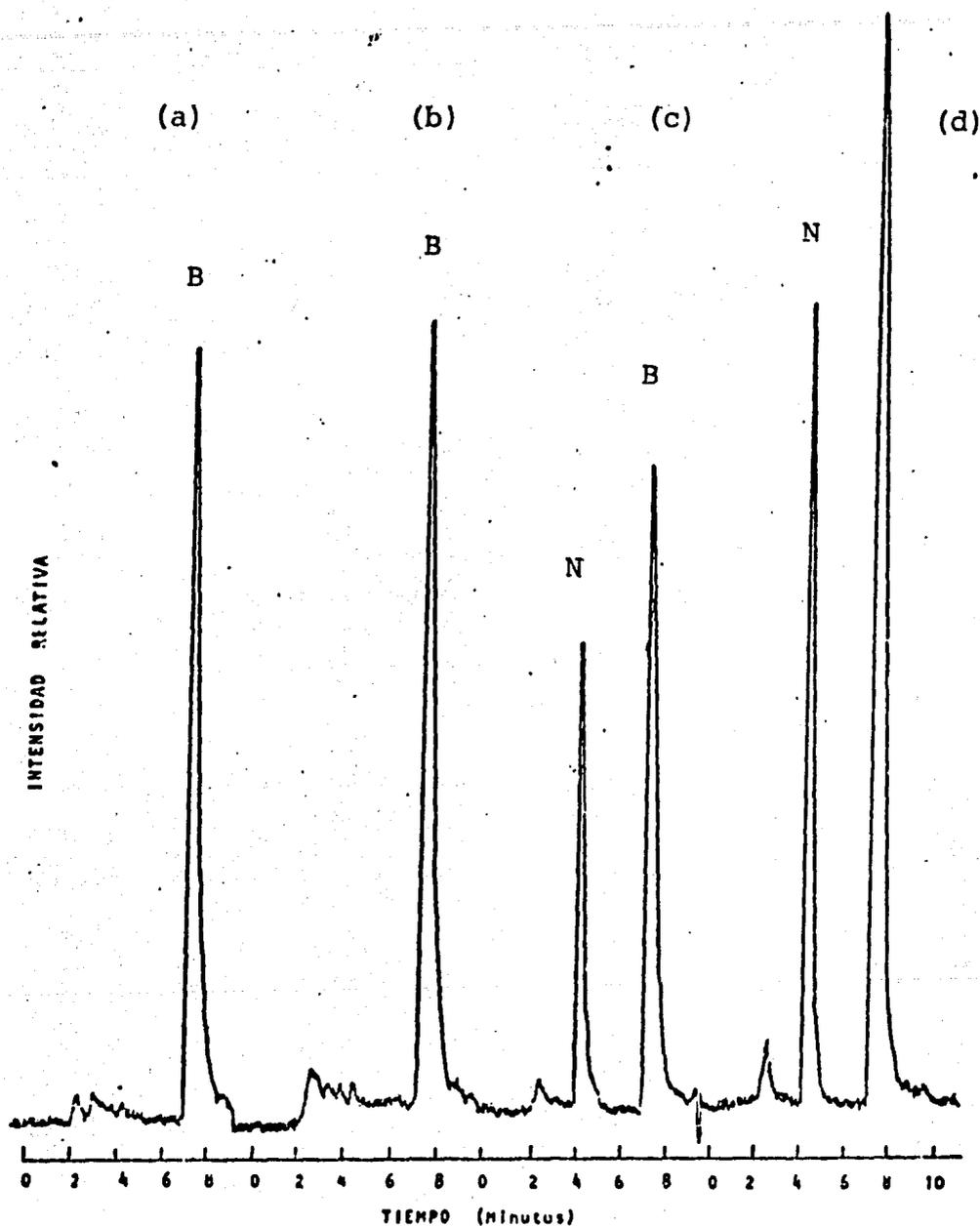


Figura 11. Cromatogramas de la neopterina (N) y la biopterina (B). (a) Cromatograma de una alícuota de GTP 2 mM incubado sin extracto enzimático; estándar interno (biopterina), 8 min (b) Cromatograma del extracto enzimático incubado sin GTP; estándar interno (biopterina), 8 min. (c) Cromatograma del producto de la reacción enzimática del extracto estriatal y el GTP 2 mM; producto de la reacción enzimática (neopterina, N), 4 min y estándar interno (biopterina B), 8 min. (d) Cromatograma de neopterina y biopterina, utilizados como estándares reales (4 y 8 min, respectivamente) para cuantificar la neopterina sintetizada y el estándar interno.

partir de GTP, en las condiciones de incubación descritas en la metodología. Además aparece la señal del estándar interno, biopterina (8 min.).

La figura 11-d corresponde a un cromatograma de estándares de neopterina y biopterina (4 y 8 min., respectivamente).

#### 4.2. Cinética de la GTP-CH.

En la figura 12 se aprecia la cinética de la reacción enzimática catalizada por la GTP-CH. Obsérvese que la producción de neopterina a partir de GTP es lineal hasta las 3 horas de incubación. La actividad específica de la GTP-CH, fue de  $16.3 \pm 1.4$  pmol/mg de proteína/hr. Los ensayos enzimáticos posteriores se realizaron en el tiempo donde la reacción enzimática es lineal.

#### 4.3. Inhibición de la actividad enzimática por ATP.

En 1976, Yim y Brown reportaron que uno de los mejores inhibidores de la actividad de la GTP-CH es el ATP.

Para probar que la actividad enzimática que se está midiendo corresponde a la de la GTP-CH, se incubaron 200  $\mu$ l del desalado con GTP (0.75 mM) en presencia de

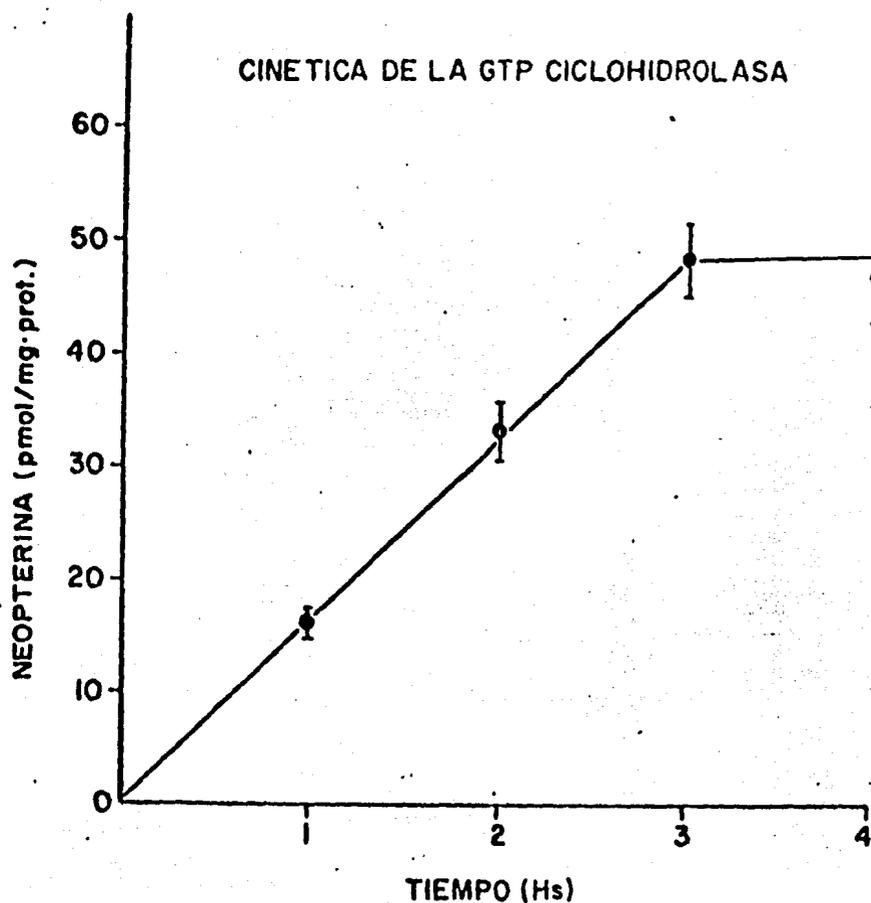


Figura 12. Cinética de la GTP-CH. En las ordenadas se grafica la cantidad de neopterina sintetizada contra el tiempo de incubación, en las abscisas. Se incubaron 200  $\mu$ l del extracto enzimático con GTP (2 mM) a 37°C a diferentes tiempos.

concentraciones crecientes de ATP ( 10, 50 y 100 mM), conocido inhibidor de la enzima. La actividad de la ciclohidrolasa control fue de  $5.5 \pm 0.27$  pmol/hr/mg de protefina y como se puede apreciar en la figura 13, el ATP inhibe la producción de neopterina en una forma dosis-dependiente. A una concentración de 10 mM la inhibió un  $73 \pm 3.4\%$  ; a 50 mM un  $87.3 \pm 1.1\%$  y a 100 mM el  $93.14 \pm 0.22\%$ .

#### 5. Actividad de la GTP-CH en los animales intoxicados crónicamente con plomo y en los controles.

La tabla 2 resume la actividad enzimática de la GTP-CH de los núcleos caudados de las ratas intoxicadas crónicamente con plomo y la de los controles.

Tabla 2. Actividad de la GTP-CH del núcleo estriado

---

\*Rata control  $15.57 \pm 0.69$  pmol/mg prot./hr

\*Rata intoxicada  $15.49 \pm 1.16$  pmol/mg prot./hr

---

Los valores representan el promedio  $\pm$  la desviación estandar de 10 (xx) y 8 (x) ensayos realizado cada uno por cuadruplicado.

Es evidente que la diferencia entre las actividades específicas de la GTP-CH de los dos grupos no fue significativa.

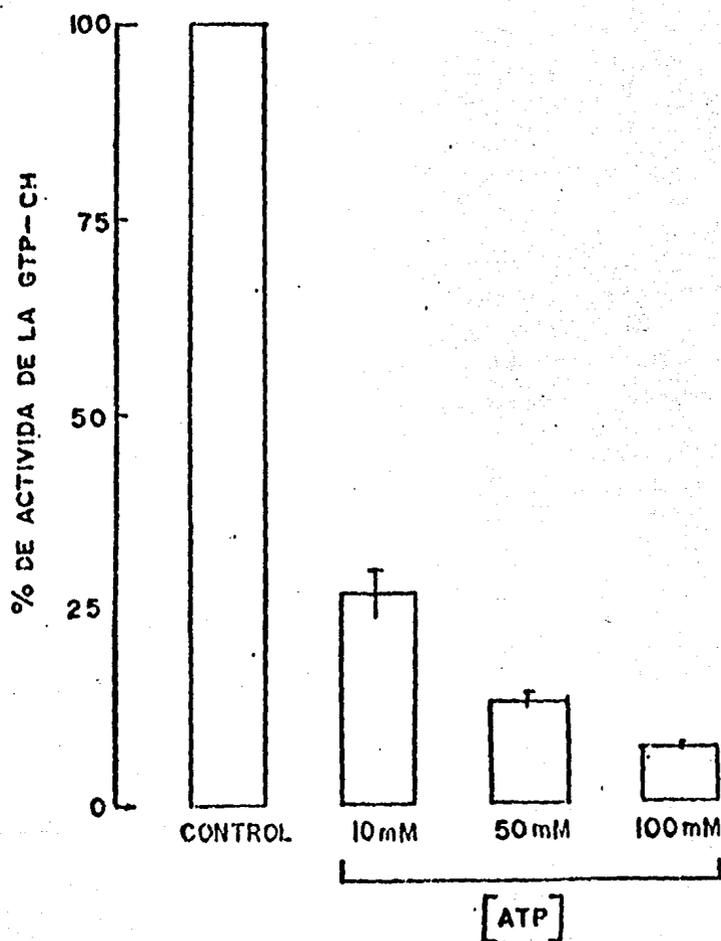


Figura 13. Inhibición de la actividad de la CH por ATP. Se incubaron 200  $\mu$ l de extracto enzimático con GTP 2 mM en presencia de concentraciones crecientes de ATP (1, 2.5, 5, 10, 20 y 50 mM) a 37 °C durante el tiempo donde la cinética de la enzima es lineal.

## 6. Concentración de bipterinas en diferentes tejidos.

Se midieron por HPLC los niveles endógenos de bipterinas en diferentes tejidos (plasma, núcleo caudado y orina) de ratas control e intoxicadas, y los resultados se expresan con el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

6.1. Plasma: Se determinó la concentración de bipterina plasmática por animal. Las ratas control tuvieron una concentración de  $12.42 \pm 1.96$  ng/ml y las intoxicadas de  $16.75 \pm 4.3$  ng/ml. Esto representa un incremento del 35% en los animales intoxicados, tomádo como 100% la concentración de los animales control. El incremento observado fue estadísticamente significativo con una  $p < 0.01$  analizado por la prueba T de Student.

6.2. Núcleo caudado: Se midió la concentración de bipterina de los 2 núcleos caudados de cada animal. Los niveles de bipterinas fueron de  $1.6 \pm 0.23$  ng/mg de proteína en los animales control y de  $2.5 \pm 0.34$  ng/mg de proteína en los intoxicados. Si se considera la concentración de los controles como el 100%, se puede observar que la concentración se incrementó un 56% en los animales intoxicados. Esta diferencia fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.02$  determinada por la prueba T de Student.

6.3. Orina: También se determinaron los niveles de bipterinas individualmente, encontrándose una concentración de  $6.5 \pm 1.3$   $\mu\text{g/ml}$  de orina en los controles y de  $5.7 \pm 1.8$   $\mu\text{g/ml}$  en los intoxicados. Como se puede notar no hay diferencias significativas.

## DISCUSION

Existen factores que modifican la sensibilidad del Método de Lowry, entre ellos el Tris y las sales (KCl y EDTA) (Bradford, 1976) por lo que se optó por determinar las condiciones más ventajosas del método para medir proteínas en las condiciones de nuestro ensayo. Como se observa en la figura 9, la longitud de onda óptima es de 750 nm y en esta longitud de onda se determinaron proteínas en todos los ensayos. Además, la BSA se resuspendió en la misma solución.

Se han reportado datos que indican que la CH es la enzima limitante en la síntesis de la  $BH_4$ , o sea, el punto donde se regula la producción del cofactor por diferentes mecanismos como la inhibición por producto (Fukushima et al., 1977; Gál et al., 1978; Nichol et al., 1985). Para evitar que las sustancias endógenas (biopterina, dopamina, etc.) modificaran la actividad de la CH, se desaló el homogenizado utilizando cromatografía de exclusión rápida con Sephadex G-25. Como se puede observar en la tabla 1, la eficiencia de las columnas fue del 93 ± 3% determinada por la recuperación de proteína y del 100% calculada por la eliminación de las biopterinas (figuras 10-b y 11-b). Nótese que en la figura 10-b no aparece la biopterina endógena ni ningún otro metabolito intermedio de la síntesis de la  $BH_4$ , a pesar de que se utilizó la sensibilidad más alta del detector

fluorométrico. También puede observarse, en la figura 11-b, que no aparece neoptarina endógena en el extracto enzimático. La eficiencia calculada por el porcentaje de recuperación de proteína al igual que por el porcentaje de eliminación de las sales, coincide con la reportada por Neal (1973). Esto demuestra que la cromatografía de exclusión utilizada para desalar es más eficiente para la eliminación de las sales que para la recuperación de proteína.

Para cuantificar las pteridinas que se purificaron por cromatografía preparativa de intercambio iónico y se concentraron por liofilización, se requirió usar una sustancia similar a ellas como estándar interno para corregir la pérdida ocasionada por el proceso. Kapatos *et al.* (1983), cuya metodología se utilizó en este trabajo, usaron la guanosina marcada con [ $^{14}\text{C}$ ] como estándar interno. Ante la imposibilidad de utilizarla en nuestro trabajo por lo elevado de su costo, se probó la 6MPH<sub>2</sub>, producto sintético, cuyo tiempo de retención fue de 18 min. Puesto que se comprobó que en el medio de reacción no hay biopterina endógena (ya que se eliminó por desalación), ni sintetizada (pues no se agregaron los cofactores, NADH + H<sup>+</sup> ni NADPH del resto de las enzimas de la vía biosintética) (ver figura 10-b), se utilizó ésta como estándar interno. El tiempo de retención de la biopterina fue de 8 minutos lo que acortó la duración de la corrida cromatográfica a 10 minutos (ver figura 11).

Cabe comentar que el GTP, que es el sustrato de la GTP-CH, tampoco interfiere en la identificación de las pteridinas; éste no se retiene en las condiciones cromatográficas usadas como así lo demuestra la figura 11-b.

Aunque por los datos anteriores existía la seguridad de que se habían eliminado todas las biopterinas y demás sustancias endógenas, fue necesario reforzar la evidencia de que la neopterina que se identificó cromatográficamente era producto de la reacción enzimática. Para esto se estudió la cinética de la GTP-CH y su inhibición por ATP.

La cinética de la GTP-CH fue lineal hasta las 3 horas de incubación (ver figura 12) lo que coincidió con el reporte de Kapatos et al. (1983). Su actividad específica se determinó dentro de la linealidad de la cinética.

Yim y Brown (1976) reportaron que el ATP, el d-GTP, y el guanosin-5'-tetrafosfato inhiben de manera competente a la GTP-CH con valores de constantes de inhibición ( $K_i$ ) de 0.25  $\mu\text{M}$ , 0.24  $\mu\text{M}$  y 0.13  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Para demostrar que la neopterina en efecto es sintetizada a partir de su precursor, en nuestras condiciones de ensayo, se exploró el efecto del ATP sobre la actividad de la GTP-CH. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 13. Como puede verse, el ATP tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima en una

forma dosis-dependiente; desde una concentración de 5 mM el ATP inhibe la síntesis de neopterina y a 50 mM la reduce hasta un 80%. De este dato, aunado a que la producción de neopterina sigue una cinética definida, se puede concluir que la neopterina que se está determinando es producto de una reacción enzimática.

Los resultados ya comentados anteriormente demuestran que la metodología implementada para medir la actividad de la GTP-CH es enteramente confiable porque no hay interferencia de productos endógenos; es específica porque solo se determina el producto enzimático; y es sensible pues las medidas se efectúan en el rango de los picomoles. Con esto se cumplió con el primer objetivo de la tesis que era montar la metodología más adecuada para medir la actividad de la GTP-CH, la cual se utilizaría para estudiar los posibles efectos de la intoxicación crónica por plomo sobre la enzima.

Los niveles endógenos de biopterinas se encontraron alterados a consecuencia de la intoxicación por plomo. En el punto 6 de resultados, se puede observar que hubo un incremento significativo de las biopterinas de un 56% en el núcleo caudado y de un 35% en el plasma de las ratas intoxicadas; no se encontraron diferencias en las concentraciones urinarias. Para valorar la repercusión que este hecho pudiera tener, es importante considerar el papel de las biopterinas en cada tejido, puesto que la técnica

cromatográfica solo mide biopterinas y no distingue directamente entre  $BH_4$  y  $BH_2$ ; sin embargo, se ha probado que la biopterina que se encuentra en el núcleo caudado corresponde a la  $BH_4$ , cofactor de la TH, mientras que la biopterina medida en plasma representa a su producto de desecho, la  $BH_2$ . En orina, la biopterina puede venir de  $BH_4$  o  $BH_2$ . Esta última es el catabolito que se va a eliminar, pero la  $BH_4$ , que también es producida por la flora bacteriana urinaria, no tiene un origen bien definido (Fukushima y Nixon, 1980; Martínez-Fong, 1987). Luego entonces, el aumento de biopterina que presentan las ratas intoxicadas en el núcleo caudado indicaría que el cofactor se encuentra aumentado en dicho núcleo, y el incremento de biopterina en el plasma, que el cofactor ha sido utilizado en mayor proporción. Estos datos sugieren que la actividad de la TH del núcleo caudado también está aumentada. El hecho de que no hubiera diferencias entre la concentración de biopterina en la orina de los animales intoxicados y de los controles podría explicarse porque la flora bacteriana del tracto urinario también contribuye a los niveles de biopterina (Fukushima y Nixon, 1980). Otros investigadores también han encontrado aumento de la biopterina plasmática en animales intoxicados crónicamente con dosis bajas de plomo (McIntosh *et al.*, 1982; Leeming y Blair, 1980) y en pacientes humanos que presentan concentraciones sanguíneas del metal (Leeming, 1981).

Para explicar el aumento de bipterina plasmática encontrado tanto en ratas como en humanos intoxicados con bajas dosis de plomo, Leeming et al.(1981) postulan que el metal ocasiona una inhibición en la enzima de la vía de recuperación de las bipterinas, la QPR. Sin embargo, esta propuesta es discutible por dos hechos: 1. Nuestros resultados indican que la  $BH_4$  se encuentra aumentada en el núcleo caudado (ver tabla 3); ésto no ocurriría si la actividad de la QPR estuviera disminuída. 2. Se ha probado que la QPR presenta una mayor actividad en los animales intoxicados, dato que contradice la hipótesis de Leeming (Gutiérrez, 1987).

Otra alternativa, además del aumento de la actividad de la QPR, que también puede explicar los niveles elevados de  $BH_4$  en el caudado, sería que hubiera un aumento en la actividad enzimática de la vía biosintética. Como la GTP-CH es la enzima limitante de esta vía, se estudió dicha posibilidad. La tabla 2 muestra que la actividad de la GTP-CH no se encuentra alterada en los animales intoxicados crónicamente a dosis bajas de plomo. Sin embargo, este hallazgo no excluye la posibilidad de que otra enzima de la vía sintética se encuentre alterada, puesto que si se observa la fig. 4 que la ilustra, se puede notar que hay tres enzimas que son reductasas como la QPR y que también podrían estar afectadas como ella en la intoxicación por plomo. Estas enzimas son: la  $A_1$  dependiente de NADPH, que reduce al 6-

(1,2-dioxopropil)-7,8-dihidropterina (DODP) para producir la sepiapterina (Tanaka et al., 1981); la sepiapterinreductasa dependiente de NADPH, que reduce a la sepiapterina para transformarla en la 7,8-dihidrobiopterina (BH<sub>2</sub>) (Kapatos et al., 1981; Kapatos et al., 1984); y para finalizar, la folato reductasa que reduce a la BH<sub>2</sub> de esta vía biosintética para transformarla a BH<sub>4</sub>. Quedaría por estudiar esta posibilidad, puesto que no se ha analizado el efecto del plomo sobre estas enzimas.

Otros hallazgos que contradicen la hipótesis de Leeming y que apoyan nuestros resultados son, que los humanos y los animales intoxicados crónicamente con plomo presentan hiperactividad (David et al., 1972; Golter y Michaelson, 1975; Silbergeld y Goldberg, 1976; Needleman et al., 1979) y las ratas, además, manifiestan una conducta estereotipada (Silbergeld y Goldberg, 1973, 1974). Estas dos conductas, al menos en los animales no intoxicados, se pueden explicar por un aumento del metabolismo y la transmisión dopaminérgica en el núcleo caudado (Starr et al., 1983) y en el accumbens (Pijnenburg y Van Rossum, 1973). El aumento del metabolismo dopaminérgico implica una mayor utilización del cofactor por la TH, lo que explicaría el incremento de los niveles sanguíneos de su catabolito, BH<sub>2</sub>, que tanto nosotros como Leeming et al. (1981) y McIntosh et al. (1982) encontramos en las ratas intoxicadas (ver tabla 3). También, el aumento del cofactor que encontramos en el núcleo caudado traería como

consecuencia una estimulación en la actividad de la TH. Se ha probado que la actividad de esta enzima se estimula cuando se incrementan los niveles de bipterina (Kaufman, 1964; Nagatsu, 1981; Martínez-Fong, 1987). Por lo tanto, el hecho de que el cofactor y su catabolito se encuentren incrementados sugiere una mayor actividad del metabolismo dopaminérgico; esto explicaría la hiperactividad y la conducta estereotipada que produce la intoxicación crónica por plomo.

## CONCLUSIONES

1.- Se logró montar una metodología confiable, específica y sensible para determinar la actividad de la GTP-CH.

2.- La intoxicación crónica a dosis bajas de plomo ocasiona aumento en la concentración de biopterinas del núcleo caudado y plasmáticas. Esto sugiere un incremento del cofactor y su catabolito debido a que ya está probado que cualquier incremento de la biopterina en el núcleo caudado corresponde al aumento de  $BH_4$ ; y que el incremento de la biopterina plasmática corresponde al de  $BH_2$  (Kapatos et al., 1982).

3.- La actividad de la GTP-CH no se encontró afectada por la intoxicación crónica.

Por lo tanto, el aumento del cofactor se podría explicar por la mayor actividad que la GPR presenta en los animales intoxicados, como lo demostraron Gutiérrez et al. (1987) y el incremento plasmático de su catabolito por la mayor utilización del cofactor por la TH.

Quedaría por confirmar la posibilidad de que la

intoxicación crónica pudiera afectar las tres enzimas reductasas que intervienen en la síntesis cerebral de la  $BH_4$ , porque si el plomo afectara a estas enzimas de la misma forma como afecta a la QPR, también esto podría explicar el aumento del cofactor.

## REFERENCIAS

- Alessio, L., P.A. Bartazzi, O. Monelli, y U. Foa (1976). Int. Arch. Occup. Environ. Health 37: 89-105.
- Angle, C.R., A. Marcus, I.H. Cheng, y M.S. McIntire (1984) Omaha childhood blood lead and environmental lead: A linear total exposure model. Environmental Research 35: 160-170.
- Arnold, L.E., P.H. Wender, K. McCloskey, y S.H. Snyder (1972) Levoamphetamine and Dextroamphetamine: Comparative efficacy in the Hyperkinetic Syndrome. Archs. Gen. Psychiatry. 27: 816-822.
- Atchison, W.D., y T. Narahashi (1984) Mechanism of action of lead on neuromuscular junctions. Neurotoxicology 5: 267-282.
- Baker, E.L., R.G. Feldman, R.A. White, J.P. Harley, C.A. Niles, G.E. Dinse, y C.S. Berkey (1984) Occupational lead neurotoxicity: a behavioural and electrophysiological evaluation. Study design and year one results. Br. J. of Industrial Medicine 41: 352-361.
- Baker, J., T. Harmony, E. Marosi, y A.M. Landazuri (1985) Características electroencefalográficas de niños escolares en áreas urbanas marginadas. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Puebla, Pue.: 220.
- Bardley, J.E., y W. Baumgartner (1958) Subsequent mental development of children with lead encephalopathy as related to type of treatment. J. Pediat. 53: 311-315.
- Benk, P.D., D.P. Tschudy, L.A. Shepley, J.G. Waggoner, y N.I. Berlin (1970) Hematologic and biochemical studies in a case of lead poisoning. Am. J. Med. 48: 137.
- Bernheimer, H., W. Birkmayer, O. Hornykiewicz, K. Jellinger, y F. Seitelberger (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. J. Neurol. Sci. 20: 415-455.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Brennan, M.J.W., y R.C. Cantrell (1979) d-aminolaevulinic acid is a potent agonist for GABA autoreceptors. Nature 280: 514-515.
- Buchtal, F., y O. Svensmark (1971) Serum concentrations of diphenylhydantoin (phenytoin) and phenobarbital and their relation to therapeutic and toxic effects. Psychiatr. Neurol. Neuroch. 19: 567-572.

Catton, M.J., M.J.G. Harrison, P.M. Fullerton, y G. Kazantzis (1970) Subclinical neuropathy in lead workers. Br. Med. J. 3: 527-540.

Chisolm, J.J. (1971) Lead poisoning. Sc. Amn. 224: 15-23.

Chisolm Jr., J.J. (1978) Heme metabolites in blood and urine in relation to lead toxicity and their determination. Advances in Clinical Chemistry 20: 225.

Chisolm Jr., J.J. (1984) The continuing hazard of lead exposure and its effects in children. NeuroToxicology 5: 23-42.

Chow, T.J., y J.L. Earl (1970) Lead aerosols in the atmosphere: increasing concentrations. Science 169: 577.

Conners, C.K. (1971) Recent drug studies with hyperkinetic children. J. Learn Disabil. 4: 476-483.

Conners, C.K. (1972) Psychological effects of stimulant drugs in children with minimal brain dysfunction. Pediatrics 49: 702-708.

Cooper, G.P., J.B. Suszkiw, y R.S. Manalis (1984) Heavy metals: Effects on synaptic transmission. NeuroToxicology 5: 247-266.

Cory-Slechta, D.A. (1984) The Behavioral Toxicity of Lead: Problems and Perspectives. En: Academic Press, Inc., pp. 211-255.

Costall, B., y R.J. Naylor (1976) Antagonism of the hyperactivity induced by dopamine applied intracerebrally to the nucleus accumbens septi by typical neuroleptics and by clozapine, sulphiride and thioridazine. Eur. J. Pharmacol. 35: 161-168.

Craine, J.E., E.S. Hall, y S. Kaufman (1972) The isolation and characterization of dihydropteridine reductase from sheep liver. J. Biol. Chem. 247: 6082-6091.

Cravioto, J., y E.R. DeLicardie (1973) Nutrition and behavior and learning. World Rev. Nutr. Diet. 16: 80.

Creese, I., y S.D. Iversen (1974) The role of forebrain dopamine systems in amphetamine induced stereotyped behaviour in the rat. Psychopharmacologia. 39: 345-357.

Creese, I., y S.D. Iversen (1975) The pharmacological and anatomical substrates of the amphetamine response in the rat. Brain Research. 83: 419-439.

David, O., J. Clark, y K. Voeller (1972) Lead & hyperactivity  
Lancet I: 900-903.

de la Burde, B., y M.S. Choate (1972) Does asymptomatic lead exposure in children have latent sequelae?. J. Pediatr. 81: 1088-1091.

Dubas, T.C., y H.R. Dina (1978) Behavioural and neurochemical consequences of neonatal exposure to lead on rats. J. Environ. Path. Toxic. 2: 473-484.

Dubas, T.C., A. Stevenson, R.L. Singhal, y P.D. Hrdina (1978) Regional alterations on brain biogenic amines in young rats following chronic lead exposure. Toxicology 9: 185-190.

Eisenberg, L. (1972) The clinical use of stimulant drugs in children. Pediatrics 49: 709-715.

Erenberg, G. (1972) Drug therapy in minimal brain dysfunction: a commentary. J. Pediatr. 81: 359-365.

Eto, I., K. Fukushima, y T. Shiota (1976) Enzymatic synthesis of biopterin from D-erythro-dihydroneopterin triphosphate by extracts of kidneys from syrian hamsters. J. Biol. Chem. 251: 6505-6512.

Fibiger, H.C., H.P. Fibiger, y A.P. Ziz (1973) Attenuation of amphetamine-induced motor stimulation and stereotypy by 6-hydroxydopamine in the rat. Br. J. Pharmacol. 47: 683-692.

Fog, R.L., A. Randrup, y H. Pakkenberg (1967) Aminergic mechanisms in corpus striatum and amphetamine-induced stereotyped behaviour. Psychopharmacologia. 11: 179-183.

Forno, L.S., y E.C. Alvord Jr (1974) The pigmentation in the nerve cells of the substantia nigra and locus coeruleus in Parkinsonism. En F.H. McDowell and A. Barbeau (eds): Advances in Neurology. New York: Raven Press, pp. 195- 202.

Fukushima, K., W.E. Richter, y T. Shiota (1977) Partial purification of 6-(D-erythro-1',2',3'-trihydroxypropyl)-7,8-dihydropterin Triphosphate Synthetase from Chicken Liver. J. Biol. Chem. 252: 5750-5755.

Fukushima, T., y J.C. Nixon (1980) Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. Anal. Biochem. 102: 176-188.

Gal, E.M. (1982) Biopterin. En A. Lajtha (ed): Handbook of Neurochemistry.: pp. 281-297.

Gal, E.M., J.M. Nelson, y A.D. Sherman (1978) Biopterin. III Purification and characterization of enzymes involved in the

cerebral synthesis of 7,8- dihydrobiopterin. *Neurochem. Res.* 3: 69-88.

---

Gallacher, J.E., P.C. Elwood, K.M. Phillips, B.E. Davies, R.C. Ginnever, C.Toothill, y D.T. Jones (1984) Vegetable consumption and blood lead concentrations. *J. of Epidemiology and Community Health* 38: 173-176.

Gerber, G.B., J. Maes, N. Guilliavod, y G. Casale (1978) Brain biochemistry of infant mice and rats exposed to lead. *Toxic Lett.* 2: 337-343.

Gershanik, O., R.E. Heikkila, y R.C. Duvoisin (1983) Effects of dopamine depletion on rotational behavior to dopamine agonists. *Brain Research* 261:358-360.

Glaser, G.H. (1967) Limbic epilepsy in childhood. *J. Nerv. Ment. Dis.* 144: 391-397.

Golter, M., y I.A. Michaelson (1975) Growth, behavior and brain catecholamines in lead-exposed neonatal rats: a reappraisal. *Science* 187: 359-361.

Govoni, S.M., L. Memo, P.F. Spano, y M. Trabucchi (1980) Brain neurotransmitter systems and chronic lead intoxication. *Pharmac. Res. Commun.* 12: 447-460.

Goyer, R.A. (1971) Lead Toxicity: a problem of environmental pathology. *Am. J. Path.* 64: 167.

Gutiérrez, M.E., J. Aceves, y D. Martínez-Fong (1987) Efecto neurotóxico del plomo en el sistema enzimático de recuperación de las biopterinas. Jalapa, Ver: XVI Congr. Nac. Soc. Mex. Bioquímica, p. 90.

Hilburn, M.E. (1979) Environmental Lead in Perspective. *Chemical Society Reviews* 8: 63-84.

Hornykiewicz, O. (1966) Metabolism of brain dopamine in human Parkinsonism. En M. Yahr, E. Costa, y L. Cote (eds): *Biochemistry and Pharmacology of Basal Ganglia Diseases*. New York: Raven Press, pp. 171-185.

Hosoda, S., y D. Glyck (1966) Studies in histochemistry LXXIX. Properties of tryptophan hydroxylase from neoplastic murine mast cells. *J. Biol. Chem.* 241:192.

Jackson, A., y P.H. Kelly (1983) Role of nigral dopamine in amphetamine-induced locomotor activity. *Brain Research* 278: 366-369.

Jackson, D.M., N.E. Anden, y A. Dahlstrom (1975) A functional effect of dopamine in the nucleus accumbens and in some other

dopamine rich parts of the rat brain. *Psychopharmacologia* 45: 139-149.

Jackson, E.A., y P.H. Kelly (1983) Role of nigral dopamine in amphetamine-induced locomotor activity. *Brain Research* 278: 366-369.

Jason, K., y C. Kellog (1981) Neonatal lead exposure: Effects on development of behavior and striatal dopamine neurons. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15: 641-649.

Jones, W., y J. Gamble (1984) Epidemiological-Environmental Study of Lead Acid Battery Workers. I. Environmental Study of Five Lead Acid Battery Plants. *Environmental Research* 35: 1-52.

Kalverboer, A.F. (1978) HBD: Discussion of the Concept. En A.F. Kalverboer, H.M. van Praag, y J. Mendlewicz (eds): *Advances in Biological Psychiatry*. Bazel:Karger, S, pp. 5-17.

Kapatos, G., S. Katoh, y S. Kaufman (1981) Sepiapterin (6-lactyl-7,8-dihydropterin) is an intermediate in bioppterin biosynthesis by a cell-free preparation from rat striatum. En E. Usdin, N. Weiner, y H.B. Youdim (eds): *Function and Regulation of Monoamine Enzymes: Basic and Clinical Aspects*. Macmillan, London, pp. 263-270.

Kapatos, G., S. Katoh, y S. Kaufman (1982) Biosynthesis of bioppterin by rat brain. *J. of Neurochemistry* 39: 1152-1162.

Kaufman, S. (1963) The structure of phenylalanine hydroxylation cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 50: 1085-1093.

Kaufman, S. (1964) Further studies on the structure of the primary oxidation product formed from tetrahydropteridines during phenylalanine hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 239: 332-338.

Kelly, P.H., y S.D. Iversen (1976) Selective 6OHDA-induced destruction of mesolimbic dopamine neurons: Abolition of psychostimulat-induced locomotor activity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 40: 45-56.

Knights, R.M., y G.S. Hinton (1979) The effects of methylphenidate (Ritalin) on the motor skills and behaviour of children with learning problems. *J. Nerv. Ment. Dis.* 148: 643-653.

Kober, T.E., y G.P. Cooper (1976) Lead competitively inhibits calcium-dependant synaptic transmission in the bullfrog sympathetic ganglion. *Nature* 262: 704-705.

Kostas, J., D.J. Mc Farlane, y D.J. Drew (1978) Lead induced

behavioural disorders in the rat: effects of amphetamine. *Pharmacology* 16: 226-236.

Kostial, K., y V.B. Vouk (1957) Lead ions and synaptic transmission in the superior cervical ganglion of the cat. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 12: 219-222.

Lasley, S.M., R.D. Greenland, D.J. Minnema, y I.A. Michaelson (1984) Influence of chronic inorganic lead exposure on regional dopamine and 5-hydroxytryptamine turnover in rat brain. *Neurochem. Res.* 9: 1675-1687.

Lasley, S.M., R.D. Greenland, D.J. Minnema, y I.A. Michaelson (1985) Altered central monoamine response to d-amphetamine in rats chronically exposed to inorganic lead. *Neurochemical Research* 10: 933-944.

Laufer, M.W., y E. Denhoff (1957) Hyperkinetic behavior syndrome in children. *J. Pediatr.* 50: 463-474.

Leeming, R.J., y J.A. Blair (1980) The effects of pathological and normal physiological processes on bipterin derivative levels in man. *Clin. Chim. Acta* 108: 103.

Leeming, R.J., A.E. Pheasant, y J.A. Blair (1981) The role of tetrahydrobiopterin in neurological disease: A review. *J. ment. Defic. Res.* 25: 231-241.

Lin Fu, J.S. (1973) Vulnerability of children to lead exposure and toxicity. *N. Engl. J. Med.* 289: 1229-1233.

Lin Fu, J.S. (1973) Vulnerability of children to lead exposure and toxicity. *New Engl. J. Med.* 289: 1289-1293.

Ljungberg, T., y U. Ungerstedt (1978) Clasification of neuroleptic drugs according to their ability to inhibit apomorphine-induced locomotion and gnawing. Evidence for two different mechanisms of action. *Psychopharmacology (Berlin)* 56: 239-247.

Ljungberg, T., y U. Ungerstedt (1985) A rapid and simple behavioural screening method for simultaneous assessment of limbic and striatal blocking effects of neuroleptic drugs. *Pharmacology and Biochemistry and Behavior* 23:479-485.

López, I., I. Andraca, y M. Colombo (1985) Relevancia de la rehabilitación psicológica en la desnutrición grave. *Anales Nestlé* 43: 32-42.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.N. Farr, y R.J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* : 265-275.

Mahaffey, K.R., J.F. Rosen, R.W. Chesney, J.T. Peeler, C.M. Smith, y H.F. De Luca (1982) Association between age, blood lead concentration and serum 1,25-dihydroxycholecalciferol levels in children. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 1327.

Manalis, R.S., y G.P. Cooper (1973) Presynaptic and postsynaptic effects of lead at the frog neuromuscular function. *Nature* 243: 354-356.

Manalis, R.S., G.P. Cooper, y S.L. Pomeroy (1984) Effects of lead on neuromuscular transmission in the frog. *Brain Research* 294: 95-109.

Margerison, J.H., y J.A. Corsellis (1966) Epilepsy and the temporal lobes. *Electroencephalographic and Neuropathological study of the Brain in Epilepsy, with particular reference to the temporal lobes.* *Brain* 89: 499.

Martínez-Fong, D., y J. Aceves (1987) Consecuencia de la Intoxicación por plomo en el núcleo caudado de la rata. *Jalapa, Ver: XXX Congr. Nac. Cienc. Fisiológica, p. 0152.*

Martínez-Fong, D., M.E. Gutiérrez, y J. Aceves (1987) Effect of chronic lead on dopamine metabolism and transmission in the rat neostriatum. *New Orleans, LA: Society for Neuroscience. Vol. 13, p. 89.*

McIntosh, M.J., M.R. Moore, J.A. Blair, M.E. Milbrun, y R.J. Leeming (1982) Lead and tetrahydrobiopterin metabolism in man and animals. *Med. Res. Soc. Abstr. Clin. Sci.* 63: 44.

McKay, H.E., A. McKay, y L. Sinisterra (1974) Intellectual Development of Malnourished Preschool Children in Programs of Stimulation and Nutritional Supplementation. *Uppsala, Suecia: Almquist & Wiksell, p. 226.*

Memo, M., L. Lucchi, P.F. Spano, y M. Trabucchi (1980) Lack of correlation between the neurochemical and behavioural effects induced by d-amphetamine in chronically lead-treated rats. *Neuropharmacology* 19: 795.

Merrit, H.H. (1975) *A textbook of Neurology.* Philadelphia: Lea and Febiger, pp. 634-635.

Millichap, J.G. (1973) Drugs in management of minimal brain dysfunction. *Ann. N. Y. Acad.* 205: 321-334.

Minnema, D.J., R.D. Greenland, y I.A. Michaels (1986) Effect in vitro inorganic lead on dopamine release from superfused rat striatal synaptosomes. *Toxicol. and ap. pharmacol.* 84: 400-411.

Moore, M.R., y P.A. Meredith (1976) The association of d-

aminolevulinic acid with the neurological and behavioral effects of lead exposure. En D.D. Hemphill (ed): Trace Metals in Environmental Health. Columbia: University of Missouri, pp. 363-371.

Nagatsu, T. (1981) Biopterin cofactor and regulation of monoamine-synthesizing mono-oxygenases. TIPS : 276-279.

Nagatsu, T., K. Mizutani, I. Nagatsu, S. Matsuura, y T. Sugimoto (1972) Pteridines as cofactor or inhibitor of tyrosine hydroxylases. Biochem. Pharm. 21: 1945.

Naylor, R.J., y J.E. Olley (1972) Modification of the behavioural changes induced by amphetamine in the rat by lesions in the caudate nucleus, the caudate-putamen and globus pallidus. Neuropharmacol. 11: 91-99.

Neal, M.W., y J.R. Florini (1973) A rapid method for desalting small volumes of solution. Analytical Biochemistry 55: 328-330.

Needleman, H., C. Gunnoe, A. Leviton, R. Reed, H. Peresic, C. Maher, y P. Barrett (1979) Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. N. Engl. J. Med. 300: 689-695.

Needleman, H.L. (1980) Lead and neurophysiological deficit: finding a threshold. En: H.L. Needleman (ed): Low level lead exposure: the clinical implications of current research.: Raven Press, pp. 43-51.

Needleman, H.L. (1983) Lead at low dose and the behavior of children. Acta Psychiat. Scand. 67: 26-37.

Needleman, H.K., L. Davidson, E.M. Sewell, y I.M. Shapiro (1974) Subclinical lead exposure in Philadelphia school-children. N. Engl. J. Med. 290: 245-248.

Nichol, C.H.A., G.K. Smith, y D.S. Duch (1985) Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. Ann. Rev. Biochem. 54: 729-764.

Nielsen, K.M., V. Simonsen, y K.E. Lind (1969) Dihydropteridine reductase: a method for the measurement of activity, and investigations of the specificity for NADH and NADPH. Eur. J. Biochem. 9: 497-502.

Nistri, A., y A. Constanti (1979) Pharmacological characterization of different types of GABA and glutamate receptors in vertebrates and invertebrates. Prog. Neurobiol. 13: 117-235.

Ordoñez, B.R., L.R. Romero, y R. Mora (1976) Investigación epidemiológica sobre niveles de plomo en la población

infantil y en el medio ambiente domiciliario de Ciudad Juárez, Chihuahua en relación con una fundición de El Paso, Texas. Bol. de la Off. San Pan. 30: 3-15.

Otto, D.A., V. Benignus, K. Muller, y C.H. Barton (1981) Effects of age and blood lead burden of CNS function in young children. I Slow cortical potentials. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 52: 229.

Otto, D.A., V. Benignus, K. Muller, C.H. Barton, K. Seiple, J. Prah, y S. Schroeder (1982) Effects of low to moderate lead exposure on slow cortical potentials in young children: Two-year follow-up study. Neurobehav. Toxicol. Teratol. 4: 733.

Palmisano, P.A., R.C. Sneed y G. Cassady (1969) Untaxed whiskey and fetal lead exposure. J. Pediatr. 75: 869-872.

Perlstein, M.A., y R. Attala (1966) Neurologic sequelae of plumbism. Clin. Pediatr. 5: 292.

Pickett, J.B., y J.C. Bornstein (1984) Some effects of lead at mammalian neuromuscular junction. Journal of Physiology. 246: C271-C276.

Piepho, R.W., C.F. Ryan, y J.P. Lacz (1976) The effects of chronic lead intoxication and the GABA content of the rat CNS. Pharmacologist 18: 125.

Pijnenburg, A.J.J., W.M.M. Honig, y J.M. Van Rossum (1975) Inhibition of d-amphetamine-induced locomotor activity by injection of haloperidol into the nucleus accumbens of the rat. Psychopharmacologia. 41: 87-95.

Pijnenburg, A.J.J., y J.M. Van Rossum (1973) Stimulation of locomotor activity following injection of dopamine into the nucleus accumbens. J. Pharm. Pharmacol. 25: 1003-1007.

Piomelli, S. (1980) The effects of Low-Level Lead Exposure on Heme Metabolism. En H.L. Needleman (ed): Low Level Lead Exposure: The Clinical Implications of Current Research. New York: Raven Press, Inc., pp. 67-74.

Piomelli, S., J.F. Rosen, J.J. Chisolm Jr, y J.W. Graef (1984) Management of childhood lead poisoning. The Journal of Pediatrics 105: 523-532.

Piomelli, S., C. Seaman, D. Zullo, A. Curran, y B. Davidow (1982) Threshold for lead damage to heme synthesis in urban children. Proceedings National Academic Science 79: 3335.

Plaa, G.L., y C.H. Hine (1960) Hydantoine and barbiturate blood levels observed in epileptics. Arch. Int. Pharmacodyn.

78: 375-382.

Purdy, S.E., J.A. Blair, R.J. Leeming, y M.E. Hilburn (1981) Effect of lead on tetrahydrobiopterin synthesis and salvage: A cause of neurological dysfunction. Intern. J. Environmental Studies. 17: 141.

Pyck, K., y P. Baines (1978) The influence of drugs on Minimal Brain Dysfunction. En A.F. Kalverboer, H.M. van Praag, y J. Mendlewicz (eds): Advances in Biological Psychiatry. Basel: Karger, S, pp. 68-83.

Pycock, C.J. (1980) Turning behaviour in animals. Neuroscience 5: 461-514.

Randrup, A., y I. Munkvad (1966) Role of catecholamines in the amphetamine excitation response. Nature (Lond) 211: 540.

Rapoport, J.L., M.S. Buchsbaum, T.P. Zahn, H. Weingartner, C. Ludlow, y E.J. Mikkelsen (1978) Dextro-amphetamine: cognitive and behavioral effects in normal prepubertal boys. Science 199: 560-563.

Rosen, J.F., R.W. Chesney, A. Hamstra, H.F. De Luca, y K.R. Mahaffey (1980) Reduction in 1,25 dihydroxyvitamin D in children with increased absorption. N. Engl. J. Med. 302: 1128.

Saenger, P., M.E. Markowitz, y J.F. Rosen (1984) Depressed excretion of 6B-hydroxycortisol in lead toxic children. J. Clin. Endocrinol. Metab. 58: 363.

Sahakian, B.J., y T.W. Robbins (1977) Are the effects of psychomotor stimulant drugs on hyperactive children really paradoxical?. Medical Hypotheses. .:

Sahakian, B.J., T.W. Robbins, H.I. Morgan, y S.D. Iversen (1975) The effects of psychomotor stimulants on stereotypy and locomotor activity in socially-deprived and control rats. Brain Research 84: 195-205.

Satterfield, J., L.I. Lesser, R.E. Saul, y D.P. Cantwell (1973) E.E.G. Aspects in the diagnosis of children with minimal brain dysfunction. Ann. N. Y. Acad. Sc. 205: 274-282.

Scanlon, J. (1972) Human fetal hazards from environmental pollution with certain nonessential trace elements. Clin. Pediatr. 11: 135-141.

Scrimgeour, K.G., y S. Cheema (1971) Discussion paper: quinonoid dihydropterin reductase. Ann. N.Y. Acad. Sci. 186: 115-118.

- Seto, D.S.Y., y J.M. Freeman (1964) Lead neuropathy in Childhood. *Am. J. Dis. Child.* 107: 337.
- Shaffer, D. (1978) Longitudinal Research and the Minimal Brain Damage Syndrome. En A.F. Kalverboer, H.M. van Praag, y J. Mendlewicz (eds): *Advances in Biological Psychiatry*. Basel: Karger, S, pp. 18-34.
- Sheffer, M.L., S.M. Grantham-McGregor, y S.J. Ismail (1981) The social environment of malnourished children compared with that of other children in Jamaica. *J. Biosoc. Sci.* 13: 19-30.
- Shellenberger, M.K. (1984) Effects of early lead exposure on neurotransmitter systems in the brain. A review with commentary. *NeuroToxicology* 5: 177-212.
- Shih, T.M., y T. Hanin (1977) Chronic lead exposure in immature animals: neurochemical correlates. *Life Sci.* 20: 309.
- Silbergeld, E.K., y J.J. Chisolm (1976) Lead Poisoning: Altered Urinary Catecholamine Metabolites as Indicators of Intoxication in Mice and Children. *Science* 192: 153-155.
- Silbergeld, E.K., y A.M. Goldberg (1973) A lead-induced behavioural disorder. *Life Sci.* 13: 1275-1283.
- Silbergeld, E.K., y A.M. Goldberg (1974) Lead-induced behavioural dysfunction: an animal model of hyperactivity. *Exp. Neurol.* 42: 146-157.
- Silbergeld, E.K., y A.M. Goldberg (1975) Pharmacological and neurochemical investigations of lead-induced hyper-activity. *Neuropharmacology* 14: 431-444.
- Silbergeld, E.K., y R.E. Hruska (1980) Neurochemical investigations of low level lead exposure. En H.L. Needleman (ed): *Low level lead exposure: The clinical implications of current research*. N. Y.: Raven Press, pp. 135-157.
- Silbergeld, E.K., y J.M. Lamon (1980) The role of altered haem synthesis in the neurotoxicity of lead. *J. occup. Med.* 25: 680-684.
- Silbergeld, E.K., L.P. Miller, y S. Kennedy (1979) GABA and seizures: Effects of subencephalopathic lead exposure on seizure sensitivity and GABAergic function. *Environ. Res.* 19: 371-382.
- Smith, H.S., L.R. King, y E.G. Margolin (1965) Treatment of lead Encephalopathy. *Am. J. Dis. Child.* 109: 322.
- Starr, M.S., M. Summerhayes, y I.C. Kilpatrick (1983)

Interactions between dopamine and gamma-aminobutyrate in the substantia nigra: Implications for the striatonigral hypothesis. *Neuroscience* 8: 547-559.

Tanaka, K., M. Akino, Y. Hagi, M. Doi, y T. Shiota (1981) The enzymatic synthesis of sepiapterin by chicken kidney preparations. *J. Biol. Chem.* 256: 2963-2972.

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.

Thornburg, J.E., y K.E. Moore (1973) The relative importance of dopaminergic and noradrenergic neuronal systems for the stimulation of locomotor activity induced by amphetamine and other drugs. *Neuropharmacology* 12: 853-866.

Ungerstedt, U. (1971) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 82: 69-93.

Weiss, B., y V.G. Laties (1962) Enhancement of human performances by caffeine and the amphetamines. *Pharmacol. Rev.* 14: 1-36.

Weiss, G., y L. Hechtman (1979) The hyperactive child syndrome. *Science* 205: 1348-1354.

Wender, P.H. (1971) Minimal brain dysfunction in children. *En Wiley Interscience.* New York.

Winder, Ch., y I. Kitchen (1984) Lead neurotoxicity: a review of the biochemical, neurochemical and drug induced behavioural evidence. *Progress in Neurobiology* 22: 59-87.

Winder, Ch., I. Kitchen, L.B. Clayton, S.M. Gardiner, J.M. Wilson, y P.D. Lewis (1984) The effect of perinatal lead administration on the ontogeny of striatal enkephalin levels in the rat. *Toxicology and applied pharmacology.* 73: 30-34.

Yamaguchi, T., T. Nagatsu, T. Sugimoto, S. Matsura, T. Kondo, y H. Narabayashi (1983) Effects of Tyrosine Administration on Serum Biopterin in Normal Controls and Patients with Parkinson's Disease. *Science* 219: 75-77.

Yim, J.J., and G.M. Brown (1976) Characteristics of GTP ciclohidrolase I purified from *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 251: 5087-5094.