

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Papel de las Especies Reactivas de Oxígeno en el daño cito y genotóxico inducido por Pb en líneas celulares: WRL-68 y 3T3.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**MARTIN ENRIQUE SILVA AGUILAR**

**MÉXICO D.F.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

Jurado Asignado:

Presidente    Prof. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ  
Vocal        Prof. GLORIA GUTIERREZ VENEGAS  
Secretario    Prof. MAHARA ANGÉLICA VALVERDE RAMÍREZ  
1er Suplente Prof. MARÍA DE LOURDES MAYET CRUZ  
2° Suplente  Prof. ANTONIO ULISES LOPEZ GUTIERREZ

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez

Asesor

Martín Enrique Silva Aguilar

Sustentante

## **AGRADECIMIENTOS**

A la gente que aportó patrocinio, conocimientos y amor a este proyecto:

Mis padres, por hacerme sentir orgullosos de ser su hijo y a mis hermanos por impulsarme a seguir pese a las dificultades.

Mahara y Emilio por darme la confianza y la oportunidad de aprender de ellos.

A mis compañeros del Laboratorio por su gran apoyo y amistad.

A mis amigas: Alicia, Dulce, Ivonne y Sandra por ser una luz en mi camino.

A mis tres angelitos: Ana Laura, Nube y Sara por darme fuerzas cuando más lo necesitaba.

Carlos Moisés y su Tía por su gran apoyo.

A las Dras. Marisol López y Gloria Gutiérrez por su orientación en este estudio.

Al profesores que exigieron de mí un esfuerzo mayor en mis estudios y que me marcaron el camino a esta área del conocimiento.

Y a todos mis amigos que me dejaron compartir este gran sueño con ellos:

Mis compañeros del Sadapi, la banda ruda, mis cuates del fútbol, a Shadday, mis amigos de la generación 2000 y 2001, mis amigos del baile y mis cuates del barrio.

## INDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1	Generalidades.....	1
1.2	Contaminación.....	2
1.3	Farmacocinética.....	5
1.3.1.	Absorción.....	5
1.3.2.	Distribución.....	5
1.3.3.	Excreción.....	6
1.4	Toxicidad.....	7
1.5	Genotoxicidad.....	10
1.6	Carcinogenicidad.....	10
1.7	Mecanismos de acción.....	11
1.8	Estrés oxidativo.....	12
<b>II.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>16</b>
<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>19</b>
<b>V.</b>	<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>19</b>
<b>VI.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>20</b>
6.1	Manejo de cultivos celulares.....	20
6.2	Tratamientos.....	20
6.3	Diseño experimental.....	21
6.4	Prueba de viabilidad/citotoxicidad.....	22
6.5	Prueba de genotoxicidad.....	22
6.6	Determinación de especies reactivas de oxígeno.....	24
6.7	Determinación de lipoperoxidación.....	25
6.8	Determinación de proteínas.....	26
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
7.1	Especies reactivas de oxígeno.....	27
7.2	Lipoperoxidación.....	29
7.3	Citotoxicidad y genotoxicidad.....	32
7.4	Correlación entre la generación de ERO con la cito y genotoxicidad.....	36
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>46</b>

# I. INTRODUCCION

## 1.1 Generalidades

El plomo es un metal clasificado en la familia IVA de la tabla periódica con un número atómico de 82 y un peso molecular de 207.19 g/mol. Trabaja con dos estados de oxidación 2+ y 4+ siendo el primero el más estable ya que en solución se comporta como catión divalente. Es un metal azul grisáceo cuando se obtiene en forma pura, aunque se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza formando gran variedad de compuestos orgánicos, inorgánicos y aleaciones.

El hombre lo ha utilizado en diversas actividades desde la antigüedad. Se sabe que los egipcios y los hebreos ya lo usaban y los fenicios ya lo extraían en España desde 2000 años a. de C. También se cree que contribuyó en gran medida a la caída del imperio romano ya que se sabe que estos utilizaban indiscriminadamente el mineral en la fabricación de vasijas, utensilios para cocina y tuberías, trayendo con esto una epidemia de intoxicación por plomo que se veía reflejada en el gran número de nacimientos de niños con deformaciones, daño cerebral e incluso mortinatos. Al correr de los años, los compuestos de plomo fueron ganando cada vez más usos en la industria, hasta nuestros días en los que se utilizan en grandes cantidades (Hernberg, 2000).

Debido a su abundancia y a sus propiedades químicas y físicas el plomo es utilizado en infinidad de procesos e industrias. Las aleaciones de plomo son utilizadas en la fabricación y reciclamiento de acumuladores, en soldaduras y como recubrimiento en algunos conductores. Los compuestos inorgánicos de plomo por su parte son utilizados en pigmentos, en el vidriado de la cerámica y

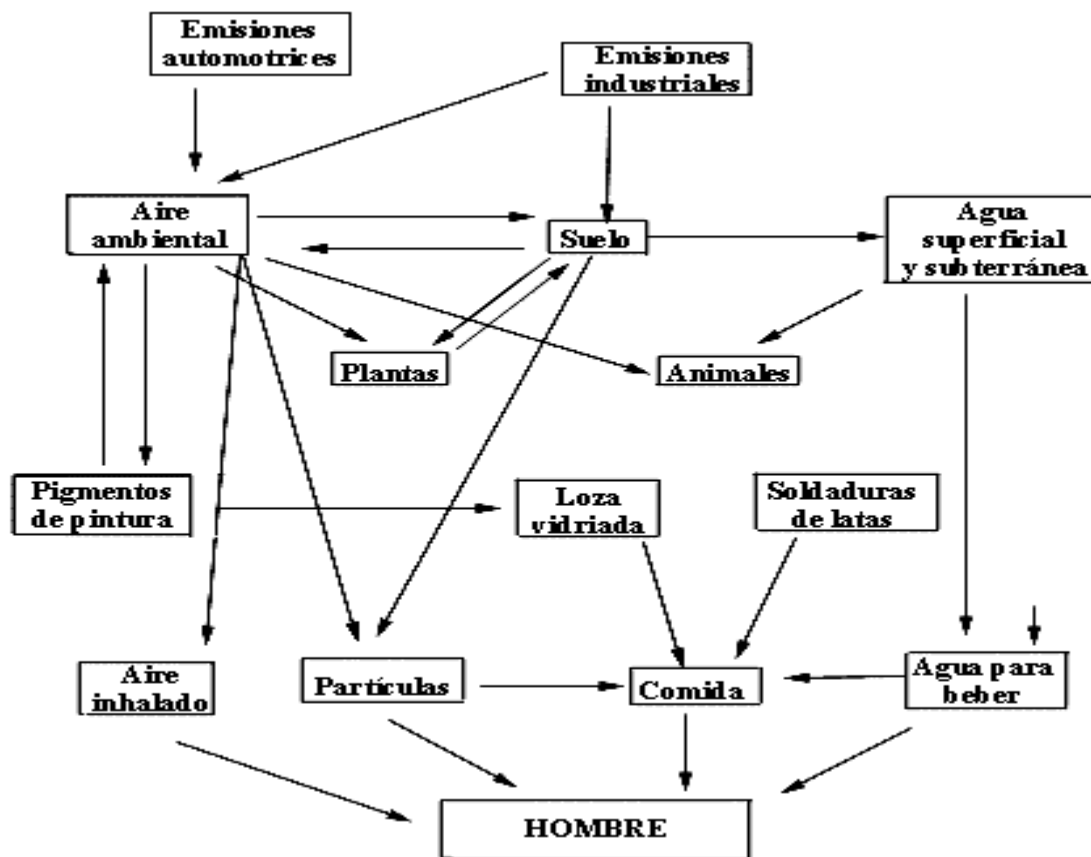
en la fabricación de vidrio, municiones y algunos plásticos. Mientras que los compuestos orgánicos de plomo como el tetrametil y el tetraetil de plomo fueron ampliamente utilizados como antidetonantes en las gasolinas. Además de esto, existen nuevos usos de los compuestos de plomo entre los que destacan; protección contra radiaciones ionizantes, en computadoras, televisores y equipo médico de resonancia magnética nuclear, soldaduras para equipos de cómputo, cerámicas para tecnología de ultrasonido y lentes de alta precisión para láseres y fibras ópticas. Existen otras fuentes de exposición al metal distintas a la industria, tal como las bebidas alcohólicas y el humo del cigarro (Stromberg et al, 2003; Ariza, 1999).

## **1.2 Contaminación**

El plomo puede encontrarse de manera natural depositado en aire, suelo y agua, sin embargo, la explotación industrial de este metal ha generado un incremento de éste en el ambiente, provocando con esto un serio problema de contaminación. El plomo generado por la actividad industrial es considerado de origen antropogénico, mientras que una fuente natural de este metal la representa su existencia en los yacimientos. Para dar un panorama de lo que representa el plomo como contaminante basta considerar que el agua de mar contiene entre 0.003 y 0.02 mg/L de plomo siendo estas concentraciones una fuente de contaminación importante para la flora y fauna de los mares (Rubio et. al., 2004). Otro ejemplo lo podemos encontrar en el suelo de terrenos no cultivados donde se han encontrado de 8 a 20 mg de Pb/Kg de suelo, mientras que en terrenos cultivados se han reportado niveles de hasta 360 mg de Pb/Kg de suelo y en suelos cercanos a fuentes de contaminación industrial se han observado concentraciones de 10 g de Pb/Kg de suelo o hasta más (Rubio et.

al., 2004). En lo que se refiere a la contaminación del aire, los niveles de plomo en zonas rurales son de alrededor de  $0.1\mu\text{g}/\text{m}^3$  o menos, sin embargo en zonas urbanas podemos encontrar cantidades entre 1 y  $3\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Rubio et. al., 2004). En lo que respecta a la producción, en 1999 México fue el sexto productor mundial de plomo generando 3,035,600 toneladas. En el panorama actual se observa un aumento en la demanda de plomo, ubicándose la demanda mundial en 7.13 millones de toneladas en el año 2005 ([www.comexperu.org.pe](http://www.comexperu.org.pe)).

Las principales fuentes de exposición a plomo para los humanos y las interacciones entre ellas pueden ser muy diversas, tal como se muestra en la figura 1 (<http://www.cepis.ops-oms.org/tutorial/casos/caso3/plom.html>).



**Figura 1. Vías de exposición humana a plomo y su cadena de difusión** (Tomado de <http://www.cepis.ops-oms.org/tutorial/casos/caso3/plom.html>).



Es necesario mencionar que los niveles ambientales de exposición a plomo han disminuido considerablemente ya que el metal se ha eliminado de productos que representaban una importante fuente de contaminación como es el caso de la gasolina y las pinturas. Sin embargo, existen poblaciones que se encuentran expuestas ocupacionalmente, tal es el caso de trabajadores de plantas recicladoras de acumuladores, en los cuales se han encontrado concentraciones circulantes en sangre periférica de hasta 100µg/dL (Palus et al, 2003).

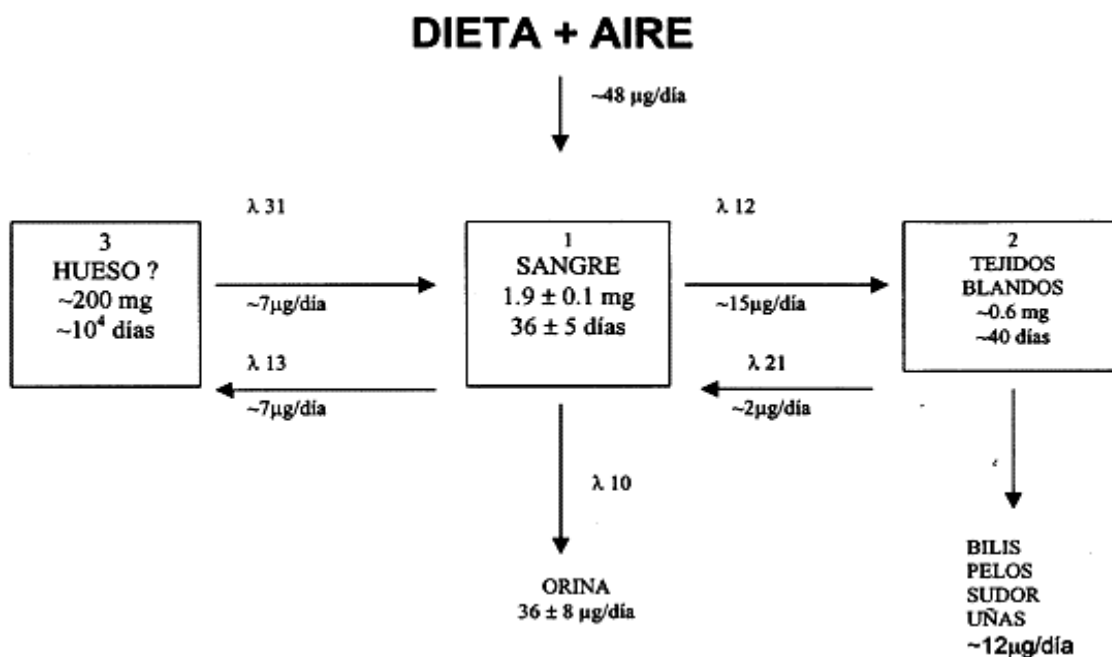
### **1.3 Farmacocinética**

Para entender los efectos del plomo en el organismo es necesario saber cual es la vía de exposición, de qué manera se distribuye y cómo es que se elimina del cuerpo, es decir, conocer lo que sucede dentro del organismo posterior a la exposición a plomo. Es importante recordar que la vía de exposición es variada (figura 1) al igual que los compuestos y las fuentes de la misma, por lo que debemos mencionar que las dos vías de exposición mas importantes son la ingestión y la inhalación ya que la absorción por la piel es mínima (Skerfving, 1988).

**1.3.1 Absorción.** Depende en gran medida de la vía por la cual el plomo ingresó al organismo así como del tamaño de partícula y la solubilidad del compuesto al que se estuvo expuesto. Además, hay factores importantes por considerar, como la edad, ya que los niños tienen una mayor absorción del plomo que los adultos (Díaz-Barriga, 1997). También el que la tasa de absorción en los pulmones es más elevada, significa que la exposición vía inhalatoria es más relevante en comparación con otras vías de exposición (Mendoza, 1996).

**1.3.2 Distribución.** Una vez que ingresar al organismo el plomo es distribuido a través del torrente sanguíneo donde se une a proteínas del plasma y rápidamente se equilibra entre los fluidos extracelulares para después ser transferido a los eritrocitos en los cuales se integra en la membrana celular, hemoglobina y otros componentes eritrocitarios. Posterior a esta integración en sangre se puede observar una alta afinidad del plomo por órganos constituidos principalmente por tejido blando como el hígado y el riñón en los cuales se alcanzan altas concentraciones de plomo por acumulación del mismo (Skerfving, 1988). También se ha observado que el plomo tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica lo cual provoca una acumulación en el tejido nervioso, en menor magnitud que en el hígado y el riñón (Skerfving, 1988). En órganos de tejido blando, es en el riñón en el cual se encuentra la mayor concentración de plomo seguido por hígado, corazón y cerebro (Goyer, 1993). Es de especial relevancia el hecho de que el plomo se acumule en una alta proporción en hueso ya que el 90% del plomo corporal se encuentra en este por largos periodos de tiempo (Skerfving, 1988). Por lo que el modelo de distribución que adopta el plomo se reduce a tres compartimentos; el primero, el de transporte a corto plazo (sangre), el segundo, el de almacenaje intermedio (tejidos blandos) y el tercero de almacenaje a largo plazo (hueso), (Rubio et al, 2004) lo cual se muestra en la figura 2. Por ultimo solo queda mencionar que el tiempo de vida media del plomo en sangre es aproximadamente de 30 días mientras que en hueso es de 17 años, siendo  $9\mu\text{g}$  almacenados diariamente en promedio en individuos no expuestos ocupacionalmente (Skerfving, 1988).

**1.3.3 Excreción.** El plomo es excretado a través de la orina y las heces. Este proceso se lleva a cabo en el riñón por filtración glomerular y secreción tubular. Se ha observado un equilibrio entre los niveles del metal en sangre y orina, es decir, cuando se observa una alta concentración de plomo en sangre la concentración en orina también aumenta. La excreción en heces se ha visto que es reducida, ya que es aproximadamente la mitad que en orina. El plomo también puede excretarse por medio de sudor, uñas, pelo y leche materna (Skerfving, 1988). A manera de resumen en la figura 2 se muestra un esquema del metabolismo del plomo propuesto por Rabinowitz y colaboradores (1976).



**Figura 2. Modelo que esquematiza el metabolismo del plomo** (Rabinowitz et. al., 1976).

## **1.4 Toxicidad**

El plomo representa un problema serio de contaminación debido a la variedad de fuentes de exposición, por lo que resulta evidente que la mayoría de los seres vivos estamos expuestos constantemente y susceptibles a sus efectos tóxicos. Nicander, un poeta griego, fue el primero en describir la intoxicación aguda por plomo a la que denominó “plumbismo” que posteriormente fue descrita con el nombre de saturnismo, esto debido a que la alquimia consideraba al plomo como el origen de todos los metales y era dedicado al Dios Saturno (Rubio et. al., 2004).

En la antigüedad resultaba común observar cuadros de intoxicación aguda por plomo, estos se caracterizaban por la presencia de cólico, dolor de cabeza, calambres, debilidad muscular, depresión, coma y la muerte (Johnson, 1998). En lo que se refiere a la intoxicación crónica, se ha observado que el plomo se deposita con facilidad en la mayoría de los tejidos del organismo causando daño en estos a diferentes niveles y con diversos síntomas dependiendo de la dosis, la edad y el tiempo de exposición. Esta intoxicación crónica es considerada generalmente como un síndrome neuromuscular, incluyendo parálisis de los nervios motores periféricos, aunque los efectos de esta intoxicación en otros sistemas son bien conocidos (Johnson, 1998). Los efectos tóxicos sistémicos reportados se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Efectos tóxicos del plomo**

Sistema afectado	Efecto	Referencia
Nervioso	Epilepsia, retraso mental, neuropatías ópticas, ceguera, decremento del IQ	Klaassen y Watkins III, 1999.
Hematológico	Anemias, incremento de reticulocitos, basofilia difusa, deficiencia de Hierro.	Klaassen y Watkins III, 1999.
Renal	Daño al riñón que puede ser agudo (reversible) o crónico (irreversible).	Klaassen y Watkins III, 1999.
Cardiovascular	Hipertensión	Nordberg et al. 2000.
Inmunológico	Disminución de anticuerpos IgA, IgG, IgM y C3 del complemento, así como disminución en el porcentaje de TCD4 e incremento de TCD8.	Basaran et al., 2000; Fernández-Cabezudo et al., 2003.
Reproductor	Decremento en el conteo de espermatozoides, volumen de esperma, alteraciones en la movilidad y estructura de los espermatozoides.	Apostoli et al., 2000; Quintanilla-Vega et al., 2000.

(Tomado de García-García, 2005).

A medida que se han descrito los efectos del plomo en los distintos sistemas del organismo, también se han estudiado sus efectos dependientes de la concentración en niños y en adultos los cuales podemos ver en la figura 3.



## 1.5 Genotoxicidad

La exposición a plomo ha demostrado dañar el ADN, por lo que se considera genotóxico (Johnson, 1998), este efecto se ha evidenciado a través de distintas pruebas cortas o “*short test*”, cuyos resultados se resumen en la tabla 2. El plomo puede causar genotoxicidad básicamente de dos formas, directamente, por la interacción con el ADN causando cambios en la conformación de éste (Smirnov y Shafer, 2000), y de manera indirecta, a través de mecanismos de acción desencadenados por el metal tales como la generación de daño oxidativo, alteración de los mecanismos de reparación, entre otros, que tienen la capacidad de generar el daño sobre el ADN (Yang et al, 1999; Hartwig, 1994; Snyder et al, 1989 y Valverde et al, 2001). Además de esto, el plomo es considerado como un comutágeno en exposiciones con luz UV (Hartwig et al, 1990)

**Tabla 2. Pruebas de genotoxicidad positivas para plomo.**

Infidelidad de la síntesis de DNA <i>in vitro</i>
Daño en el DNA de células de mamífero
Aberraciones cromosómicas en células de mamífero
Intercambio de cromátidas hermanas en células de mamífero
Mutaciones en TK o HGPRT en células de mamífero
Transformación morfológica
Aumento de transformación viral
Letales dominantes y letales recesivos ligados al sexo en <i>Drosophila</i>
Anormalidades en espermias en mamíferos en pruebas <i>in vivo</i>
Mutaciones o aberraciones cromosomales en plantas grandes

(Tomado de Johnson, 1998)

## 1.6 Carcinogenicidad

La carcinogenicidad de metales ha sido atribuida a la capacidad que tiene de ocasionar daño en el ADN, específicamente, mutaciones, daños a nivel cromosómico así como también la generación de Especies Reactivas de

Oxígeno (ERO) (Waalkes et al, 1995). Además, se ha demostrado la capacidad transformante del plomo en células Balb-3T3 (Kajiwara y Ajimi, 2003).

Los compuestos inorgánicos de plomo están catalogados por la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) en el grupo 2B, es decir, como posibles carcinógenos para humanos; mientras que los compuestos orgánicos de plomo son catalogados dentro del grupo 3, es decir, no clasificables como carcinógenos para humanos. Los cánceres asociados con la exposición a plomo son; pulmón, estómago, hígado y vejiga (*Report on carcinogens background document for lead and lead compounds, Department of Health and Human Services, 2003*).

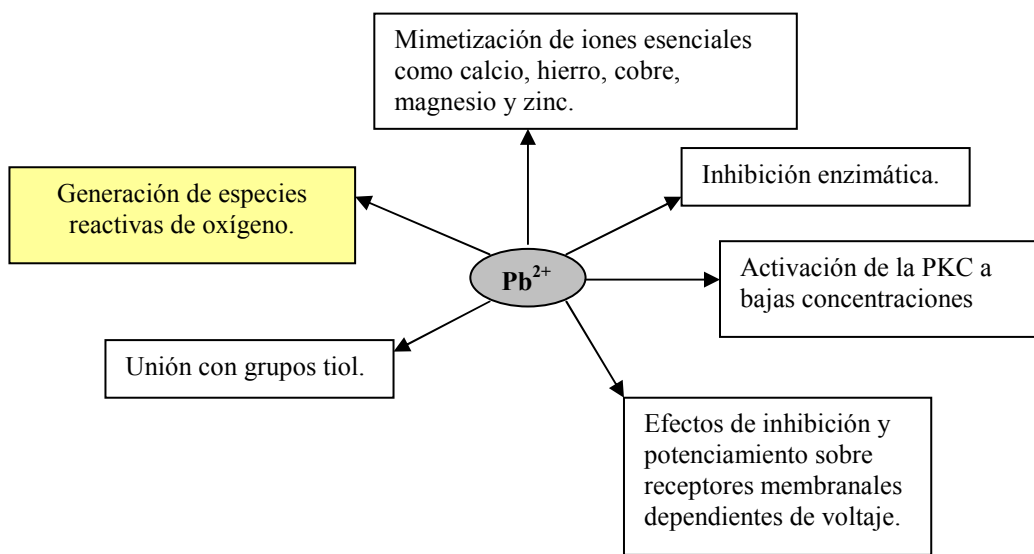
En los estudios realizados en animales se ha obtenido suficiente evidencia para catalogar a los compuestos de plomo como carcinógenos en éstos. A partir de estos trabajos, se considera que la exposición a altas concentraciones de acetato de plomo y de fosfato de plomo son carcinogénicas para roedores y el cáncer que con mayor frecuencia se presenta es el cáncer de riñón (IARC, 1998). Si bien, la capacidad transformante del plomo en animales es una realidad al igual que su asociación con algunos cánceres humanos, los mecanismos de acción mediante los cuales se generan estos efectos son propuestas basadas principalmente en estudios *in vitro* (Silbergeld et al, 2000; Silbergeld, 2003).

### **1.7 Mecanismos de acción del plomo**

Por sus características de catión divalente el plomo resulta una molécula altamente reactiva bioquímicamente, es decir, puede involucrarse en diversos procesos celulares y alterar la homeostasis celular, debido a que no es un ion



esencial (Ariza, 1999). Por esto, la mayoría de los mecanismos asociados a la toxicidad del plomo están involucrados en procesos donde participan otros iones divalentes que si son esenciales para el funcionamiento celular, tales como el calcio (Calderon-Salinas et al, 1999). En la figura 4 se esquematizan los mecanismos de acción que tratan de explicar la toxicidad del plomo.



**Figura 4. Mecanismos de acción del plomo** (Johnson, 1998).

### 1.8 Estrés oxidativo

Un mecanismo de acción propuesto por el cual los metales tiene un efecto tóxico es la generación de radicales libres, además de la disminución de antioxidantes como el glutatión (Klein et al, 1991). El plomo ha mostrado incrementar la producción de peróxido de hidrogeno en células (Yang et al, 1999), así como la generación de radicales libres a partir de la acumulación de ácido aminolevulínico (Gurer y Ercal, 2000).

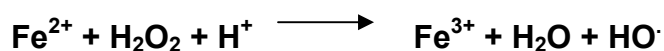
También se ha observado que la generación de ERO por parte del plomo causa daño oxidativo en el ADN a través de la formación de 8- hidroxiguaninas en células de ovario de hámster chino (CHO) (Yusof et al, 1999). La capacidad de generar estrés oxidativo por parte del plomo es un hecho, sin embargo, esta capacidad se ha determinado por exposiciones a concentraciones elevadas del metal, donde también se han evidenciado efectos tóxicos severos como daño tisular o citotoxicidad (*Report on carcinogens background document for lead and lead compounds, Department of Health and Human Services, 2003*).

El estado redox juega un papel muy importante en el metabolismo celular ya que regula una gran cantidad de procesos celulares. Dicho estado se modula básicamente por dos factores opuestos: antioxidantes, los cuales son producidos de manera fisiológica durante el metabolismo celular o pueden ser adquiridos en la dieta, y oxidantes, que de igual manera son producidos durante el metabolismo celular o pueden generarse por la exposición a algunos agentes ambientales, como por ejemplo, los metales. La pérdida del equilibrio entre antioxidantes y oxidantes conduce al estado conocido como estrés oxidativo que afecta de manera importante el estado redox óptimo de la célula conduciendo posteriormente a daño e incluso a la muerte celular (Ariza, 1999). Regularmente el estrés oxidativo se relaciona únicamente con el incremento de oxidantes en la célula, pero es necesario hacer notar que también el aumento o disminución de antioxidantes puede generar este estado de estrés.

Por lo general las especies oxidantes más comunes son las especies reactivas de oxígeno, dentro de las cuales podemos encontrar varios radicales libres y otras especies no radicales. Los radicales libres son definidos como cualquier molécula capaz de existir de manera independiente con uno o más electrones

desapareados, mientras que las especies reactivas son moléculas de alta reactividad pero que no necesariamente contienen en su estructura electrones desapareados (Ariza, 1999; Halliwell, 1999; Valko et al, 2006).

La formación de especies reactivas de oxígeno puede llevarse a cabo de varias maneras, una de ellas es mediante reacciones tipo fenton, donde los metales como el hierro reaccionan con el peróxido de hidrógeno para formar especies más reactivas, esto lo podemos ver en la figura 5 (Ariza, 1999). Los radicales son formados en todos los compartimentos celulares como, lisosomas, mitocondria, peroxisomas, retículo endoplásmico, citoplasma y membranas celulares (Ariza, 1999).

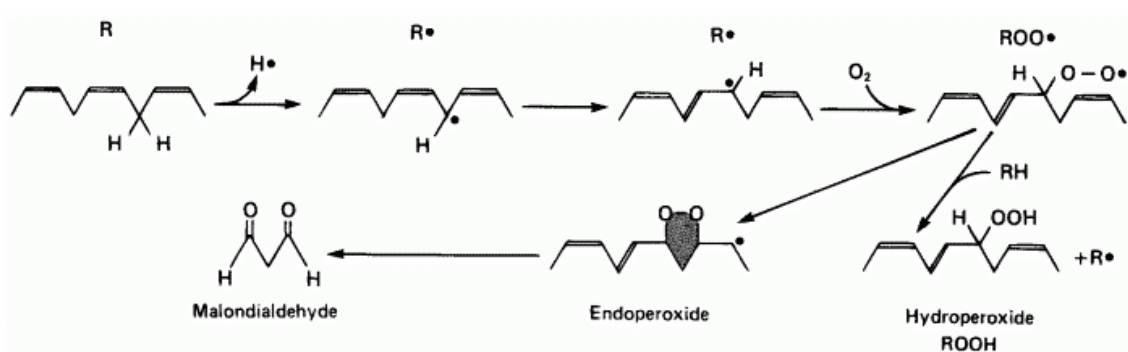


**Figura 5. Reacción de Fenton** ([www.bendest.com/lifeex/aging.html](http://www.bendest.com/lifeex/aging.html)).

Estos radicales tienen la capacidad de generar daño en las principales macromoléculas celulares como, el ADN, las proteínas y los lípidos. Este daño puede conducir al mal funcionamiento celular e incluso, dependiendo el nivel de daño, puede ocasionar la muerte de la célula. La oxidación de carbohidratos de la superficie celular conduce a la modificación de receptores de membrana siendo principalmente afectada la unión con el ligando que a su vez produce un efecto dramático en la respuesta celular ante estímulos ambientales, alteraciones en los procesos de señalización y expresión de genes (Ariza, 1999).

Un efecto ampliamente observado como causa del daño producido por las especies reactivas de oxígeno es la lipoperoxidación, que como su nombre lo indica se refiere a la oxidación de lípidos. En la célula la principal fuente de

lípidos son las membranas celulares, sin embargo, esta oxidación se lleva a cabo preferentemente sobre las ácidos polinsaturados. Es necesario hacer notar que esta oxidación conlleva consecuentemente a otras oxidaciones pasando por la formación de hidroperoxidos de los lípidos y teniendo como productos finales aldehídos como el malondialdehído (MDA), este proceso se esquematiza en la figura 6. El MDA es el aldehído que se forma con mayor abundancia como consecuencia de la lipoperoxidación por lo que se utiliza como indicador de daño oxidativo, además de esto, es considerado tóxico y mutagénico debido a su capacidad de formara aductos con el ADN (Marnett, 1999).

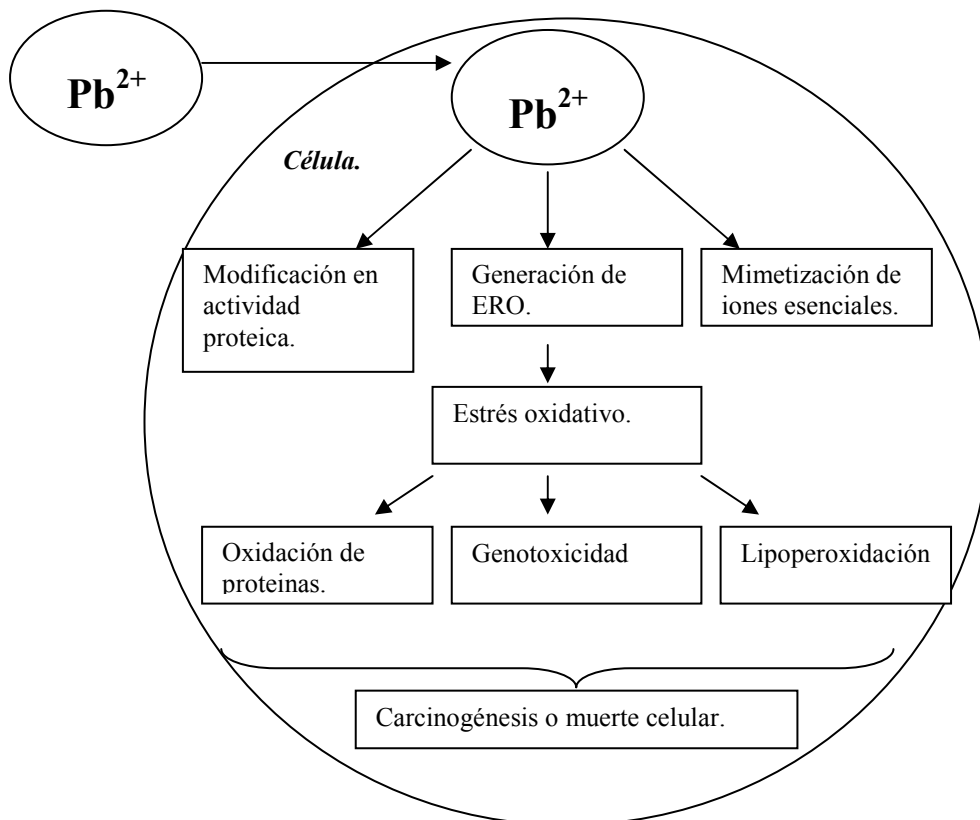


**Figura 6. Esquema de reacción de lipoperoxidación** ([www.bendest.com/lifeex/aging.html](http://www.bendest.com/lifeex/aging.html) ).

## II. Planteamiento del Problema

Los efectos adversos del plomo sobre la salud y su potencial carcinogénico han sido planteados por diversos grupos de trabajo de manera controversial (Jonson, 1998; Klaassen y Watkins III, 1999, Gurer et al., 1999, 2000; Ariza, 1999; Silbergled, 2003). Es por ello que los efectos genotóxicos del metal ocasionados por la exposición equiparable a la de personas expuestas ocupacionalmente es el tema central del presente trabajo, aunado a evidenciar el papel de las especies reactivas de oxígeno como mecanismo de acción intermediario en la generación de daño al ADN en líneas celulares de diferente origen y estirpe, las células 3T3, que son fibroblastos murinos transformados y las WRL-68, hepatocitos embrionarios humanos inmortalizados.

En la figura 7 mostramos un esquema de los eventos celulares que suponemos ocurren a partir de la exposición a plomo, donde básicamente se plantea la genotoxicidad como una consecuencia de la generación de estrés oxidativo. En principio planteamos el incremento de especies reactivas de oxígeno, que ejercen efectos sobre los lípidos de membranas generando lipoperoxidación y la formación de rompimientos en el ADN.



**Figura 7. Resumen de los efectos celulares que el plomo puede ocasionar en la célula.**

### **III. Hipótesis**

La exposición a plomo en diferentes líneas celulares provocará un aumento en las especies reactivas de oxígeno que se verá reflejado en incrementos del daño cito y genotóxico dependiente de la concentración y el tiempo de exposición.

#### **IV. Objetivo general**

Determinar si las especies reactivas de oxígeno inducidas por la exposición a plomo son las responsables del daño cito y genotóxico en líneas celulares WRL-68 y 3T3 al ser expuestas a concentraciones equimolares a las reportadas en personas ocupacionalmente expuestas a plomo.

#### **V. Objetivos particulares**

- 1.- Evaluar los niveles de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y del subproducto de peroxidación lipídica, malonildialdeído (MDA) inducidos en las líneas celulares WRL-68 y 3T3 tras la exposición a plomo (0, 0.5, 5, 15 y 30  $\mu\text{M}$ ).
- 2.- Determinar la citotoxicidad producida en las líneas celulares WRL-68 y 3T3 al ser expuestas a plomo (0, 0.5, 5, 15 y 30  $\mu\text{M}$ ).
- 3.- Determinar la genotoxicidad en las líneas WRL-68 y 3T3 inducida por la exposición a plomo (0, 0.5, 5, 15 y 30  $\mu\text{M}$ ).
- 4.- Evaluar si existe correlación entre la inducción de especies reactivas de oxígeno con la cito y genotoxicidad.



## VI. METODOLOGIA

### 6.1 Manejo de Cultivos Celulares

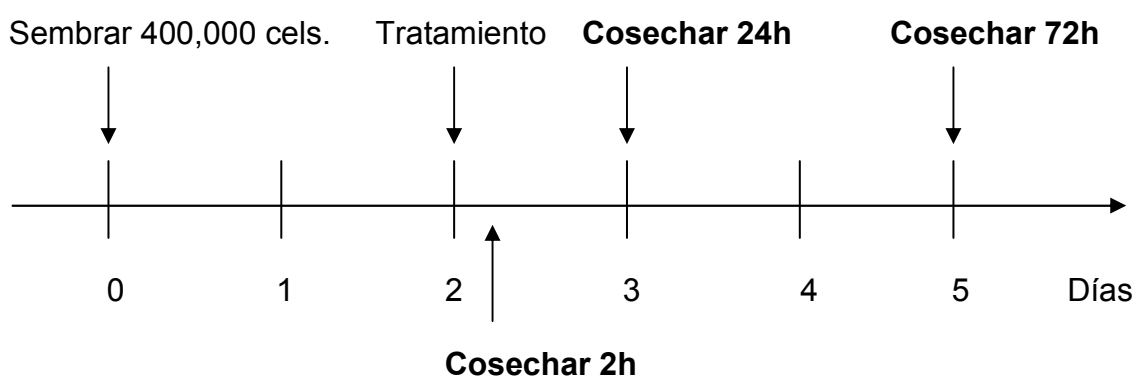
Se trabajó con dos líneas celulares; WRL-68 las cuales son células hepáticas embrionarias humanas inmortalizadas y 3T3 que son fibroblastos murinos transformados. Estas células fueron cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de antibióticos (penicilina y estreptomina) y 1% de aminoácidos no esenciales. Fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante el tiempo establecido para cada tratamiento.

### 6.2 Tratamientos de Pb

Se prepararon soluciones madre de acetato de plomo para obtener finalmente al momento de agregarse a los cultivo celulares, las concentraciones equivalentes a las determinadas en personas ocupacionalmente expuestas (5 µM) (Palus et al, 2003), además de dos concentraciones menores y dos mayores a estas. Es decir, los tratamientos de plomo fueron; 0, 0.5, 5, 15 y 30 µM respectivamente.

### 6.3 Diseño experimental

- Exposición de 400,000 células 3T3 ó WRL-68 en cajas de cultivo de 10mm. Los tratamientos fueron realizados por triplicado para cada concentración y tiempo de exposición (2, 24 y 72 horas).
- Para controlar la cantidad de células a sembrar, se contaron mediante una tinción de azul tripano en un hemocitómetro, considerando únicamente las células vivas. El colorante utilizado en esta tinción solamente se integrará a la célula si su membrana no está íntegra lo que nos permite diferenciar entre células vivas y muertas.



- Las células se cosecharon después de transcurrido el tiempo respectivo para cada tratamiento en una solución de fosfatos (PBS) a un pH de 7.4.
- A las células cosechadas se les determina inmediatamente citotoxicidad, genotoxicidad y ROS. Las demás células se mantienen en PBS con inhibidores de proteasas para determinar posteriormente lipoperoxidación y cuantificar proteína total.

#### **6.4 Prueba de viabilidad/citotoxicidad**

La técnica utilizada para esta determinación es una prueba de actividad metabólica basada en una tinción dual por fluorocromos, en la que un colorante, el diacetato de fluorosceína, es metabolizado por los lisosomas de la célula generando un compuesto fluorescente que indica la viabilidad celular al emitir una fluorescencia verde; mientras que el segundo colorante, bromuro de etidio, se intercala en el ADN de la célula reflejando la presencia de alteraciones en la envoltura nuclear que permiten la entrada del colorante al núcleo de las células muertas emitiendo una fluorescencia roja (Strauss, 1991). Se toma una alícuota de células (5 $\mu$ L) al momento de la cosecha y se mezcla con 5 $\mu$ L de la solución de colorantes preparada en fresco y protegida de la luz, posteriormente se resuspenden ambas soluciones y se colocan sobre una laminilla de vidrio para su observación bajo el microscopio de fluorescencia (Olympus BX60), empleando un filtro dual (U-M61002/410) que permita visualizar ambas fluorescencias a la vez. Se evaluaron 100 células de diferentes campos de la preparación y se determinó el porcentaje de células vivas y muertas.

#### **6.5 Prueba de genotoxicidad**

La técnica utilizada fue la electroforesis unicelular o también conocida como ensayo cometa, esta es una prueba que evalúa el daño clastogénico presente en células individuales (Rojas et al., 1999). Es llamado ensayo cometa ya que lo que se observa en el microscopio de fluorescencia posterior a una electroforesis en ambiente alcalino (pH >13) y una tinción con bromuro de

etídio son imágenes que asemejan a cometas estelares, con una cabeza y una cola altamente fluorescentes, en los cuales el daño se ve reflejado como variaciones en el largo y la intensidad de fluorescencia de la cola. Esta técnica se divide básicamente en cuatro pasos fundamentales (Rojas et al., 1999) que son las siguientes:

- Preparación de las laminillas. Las laminillas para el ensayo deben ser previamente preparadas con una primera capa que consta de 175 $\mu$ L de agarosa regular al 0.5%, inmediatamente después de cosechar las células se toman 100 $\mu$ L de suspensión celular y se mezclan con 150 $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%, de esta mezcla se toman 75 $\mu$ L que se agregan a la laminilla previamente preparada (se realizan por duplicado) y se coloca un cubreobjetos, una vez que solidifica, se retira el cubreobjetos y se coloca una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión que igualmente se deja solidificar en frío.
- Lisis. A las laminillas preparadas se les quita el cubreobjetos y se depositan en un vaso koplíng con solución de lisis [40 ml de solución Stock de lisis pH 10 (2.5mM NaCl, 100mM EDTA, 100mM Tris), 10% DMSO, 1% Tritón X-100] y se mantiene al menos una hora a 4°C.
- Electroforesis alcalina a pH >13. Cabe mencionar que este proceso se realiza en frío y en condiciones de luz amarilla. Se prepara la solución alcalina (3N NaOH, 1mM EDTA) y se vierte en una cámara de electroforesis horizontal que contiene las laminillas, éstas se incuban por 10 minutos, que es el tiempo establecido para el desenrollamiento del ADN en estas líneas celulares, cuando este tiempo ha transcurrido, se da inicio a la

electroforesis a 25V y 300 mA (0.8 V/cm) por 10 minutos. Al término de ésta, las laminillas son neutralizadas con una solución de Tris-Base 0.4 M pH7.5 para finalmente deshidratar las laminillas con alcohol absoluto y generar una preparación permanente, la cual se almacena hasta su evaluación.

- Evaluación de laminillas. Para ser evaluadas las laminillas se tiñen con 20  $\mu$ L de una solución diluida de bromuro de etidio 0.1 X (20  $\mu$ g/ mL), se coloca un cubreobjetos y se observa bajo el microscopio de fluorescencia (filtro de excitación de 515-560 nm y filtro de barrera de 590 nm) con el objetivo de 20X acoplado a un digitalizador de imágenes en el cual se evaluaron 50 células por cada una de las dos laminilla preparadas por punto, utilizando el software KOMET v.31 de Kinetic Imagin. Este programa realiza un análisis desplegando varios parámetros, para este trabajo solo se muestra el momento de la cola de Olive, que en las gráficas se abrevia OTM, este parámetro es calculado mediante un algoritmo que integra la distancia que migraron en el campo eléctrico los fragmentos de ADN rotos y el porcentaje que estos representan del núcleo con base a la intensidad de fluorescencia emitida.

## **6.6 Determinación de Especies reactivas de Oxigeno (ERO)**

Esta técnica se basa en la oxidación de la dhidrorodamina-123 a rodamina-123 causada por especies reactivas de oxigeno (Lee et al, 2003). A partir de alícuotas de 100  $\mu$ L de las muestras cosechadas se realizó el ensayo centrifugando las muestras a 1200 rpm por 5 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante y se agregó al botón celular 180  $\mu$ L del amortiguador

A (140mM NaCl, 5mM KCl, 0.8mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM glucosa, 15 mM HEPES) y 20 µL de dihidrorodamina 123, 1mM. Esta mezcla se coloca en una placa para ELISA de 96 pozos y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 505 nm. Los resultados se interpolan en una curva patrón de rodamina-123 en PBS en concentraciones de 0 –10 µM.

### **6.7 Determinación de lipoperoxidación (malonildialdheido)**

Esta técnica se basa en la reacción entre el malonildialdehido (MDA) y el ácido tiobarbitúrico (TBA) en la cual dos moléculas de TBA reaccionan con una molécula de MDA formando un aducto, el cual en solución tiene una coloración rosada que se detecta en el espectro visible a una longitud de onda de 532 nm (Castilla et al, 2004). Para esta determinación se utilizan las células cosechadas después de haber sido lisadas con un sonicador (Ultrasonic Homogenizer 4710) a 4°C sometiéndolas a 10 pulsos de 10 segundos a una amplitud de 20mHz. Posteriormente se toman 100 µL de estas muestras y se agregan 100 µL de ácido tricloroacético al 10 % y se centrifugan a 3000 x g por 10 minutos a 4°C, se toma el sobrenadante y se agrega a un tubo con 1 mL de TBA al 0.375% y 2% de ácido acético donde se incuban a 92°C por 45 minutos. Transcurrido este tiempo se toman 200 µL de cada tubo y se colocan en una placa de ELISA de 96 pozos y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 532 nm. Los resultados se interpolan con una curva patrón de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (MDA), el cual es sometido a toda la reacción con el TBA, en concentraciones de 0-10 nM.

## 6.8 Determinación de proteínas

Esta técnica se basa en dos reacciones simultáneas que son; la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  realizada por las proteínas en medio alcalino (reacción de Biuret) y en la reacción entre dos moléculas de ácido bicinónico (BCA) y el ion cuproso ( $\text{Cu}^{1+}$ ), en la cual se forma un aducto de coloración morada entre estas dos especies que se lee en el espectro visible a una longitud de onda de 562 nm (Pierce, 1984). Para este ensayo se toman 25  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se agregan en los pozos de la placa de ELISA de 96 pozos que contiene 200  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo que fue preparada con reactivo A (Carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinónico y tartrato de sodio en 0.1M hidróxido de sodio) y reactivo B (Sulfato de cobre 4%) en proporción 50:1 respectivamente, se agitan por 30 segundos y se incuban por 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se lee la absorbancia a 562 nm. Los resultados son interpolados en una curva patrón de albúmina en concentraciones de 0-2000  $\mu\text{g/mL}$ .

## 6.9 Análisis Estadístico

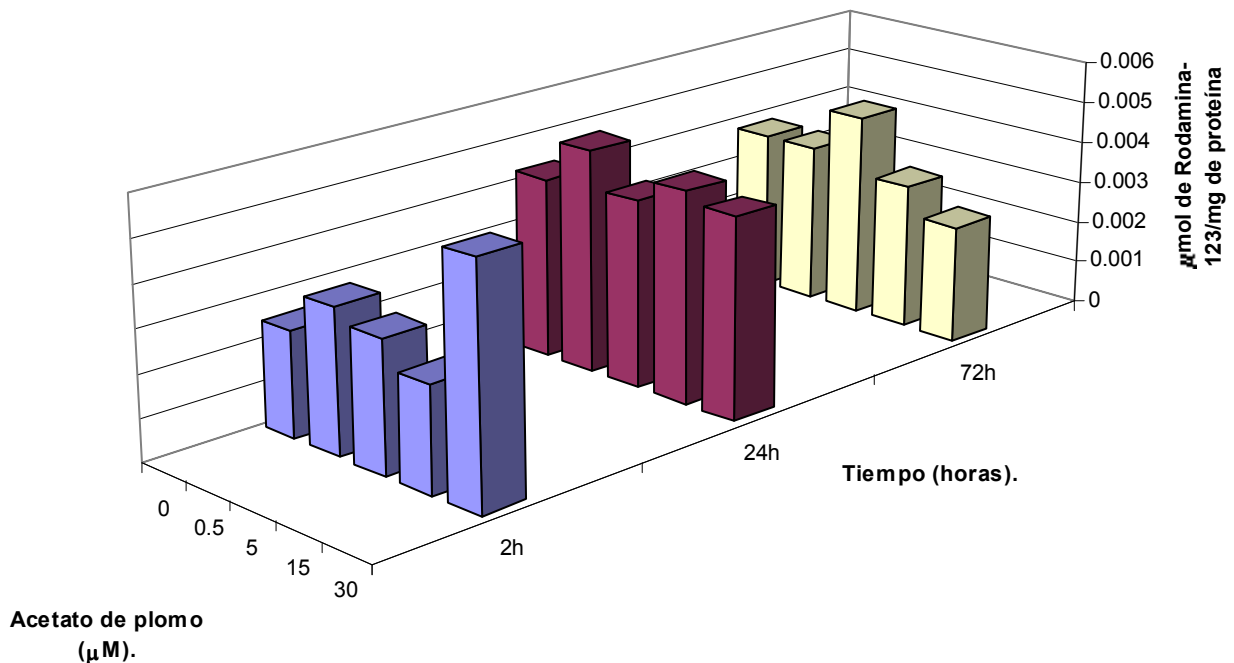
Para determinar las diferencias estadísticas entre las células tratadas con plomo y los controles, para cada uno de los parámetros determinados (ERO, lipoperoxidación, citotoxicidad y genotoxicidad) se utilizó un análisis de varianza (ANOVA de los expuestos vs controles) tomando una  $p < 0.05$  como significativa. Esto se realizó en el programa *GraphPAD In Stat*, versión 1.14(1990).

Mientras que para las correlaciones realizadas entre los parámetros medidos se utilizó el análisis de correlación simple de Pearson con una  $p < 0.05$ , utilizando el programa *Statistica*, versión 6.0 (1998).

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).

Se determinó la generación de ERO en las líneas celulares WRL-68 y 3T3 posterior a la exposición a plomo en concentraciones equivalentes a las circulantes en POE. Los resultados de estos ensayos se muestran en las gráficas 1 y 2, mientras que el porcentaje de inducción de ERO con respecto al control se muestra en las tablas 1 y 2 para las células WRL-68 y 3T3 respectivamente.



**Gráfica 1. Determinación de ERO (μmol de rodamina-123/mg de proteína) en células WRL-68 tratadas con acetato de plomo.**

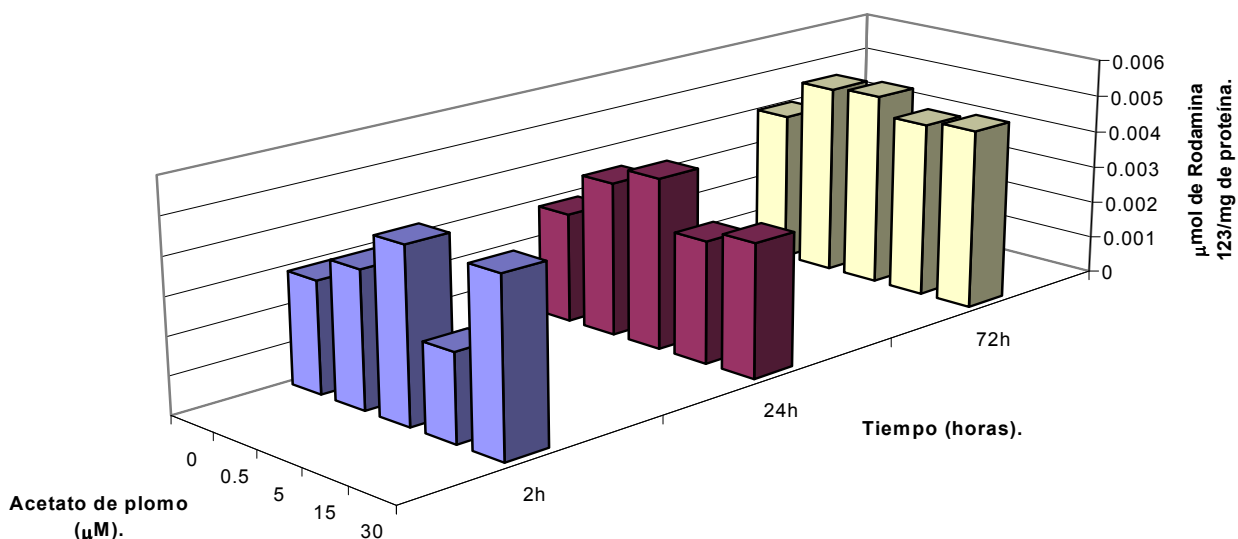


**Tabla 1. Porcentaje de inducción de ERO con respecto al control, en células WRL-68 tratadas con acetato de plomo.**

Acetato de Plomo ( $\mu\text{M}$ )	2h	24h	72h
0.5	36.74 $\pm$ 2.38*	23.49 $\pm$ 1.26*	0 $\pm$ 10.5
5	23.48 $\pm$ 1*	3.42 $\pm$ 2.26	27.23 $\pm$ 7.08
15	0 $\pm$ 9.67	16.06 $\pm$ 3.06**	0 $\pm$ 7.35
30	122.78 $\pm$ 1.03***	10.07 $\pm$ 2.57*	0 $\pm$ 21.29

\* p < 0.05 vs control; \*\* p < 0.01 vs control; \*\*\* p < 0.001 vs control

En la gráfica 1 podemos observar que la exposición a acetato de plomo durante 2 y 24 horas tiende a incrementar los niveles de ERO en la línea celular WRL-68, mientras que en la exposición de 72 horas muestra una disminución en los niveles de estas especies. Estas tendencias son más claras al analizar las inducciones con respecto a los controles de cada tiempo de exposición que se muestran en la tabla 1.



**Gráfica 2. Determinación de ERO ( $\mu\text{mol}$  de rodamina 123/mg de proteína) en células 3T3 tratadas con acetato de plomo.**

**Tabla 2. Inducción de ERO en células 3T3 tratadas con acetato de plomo.**

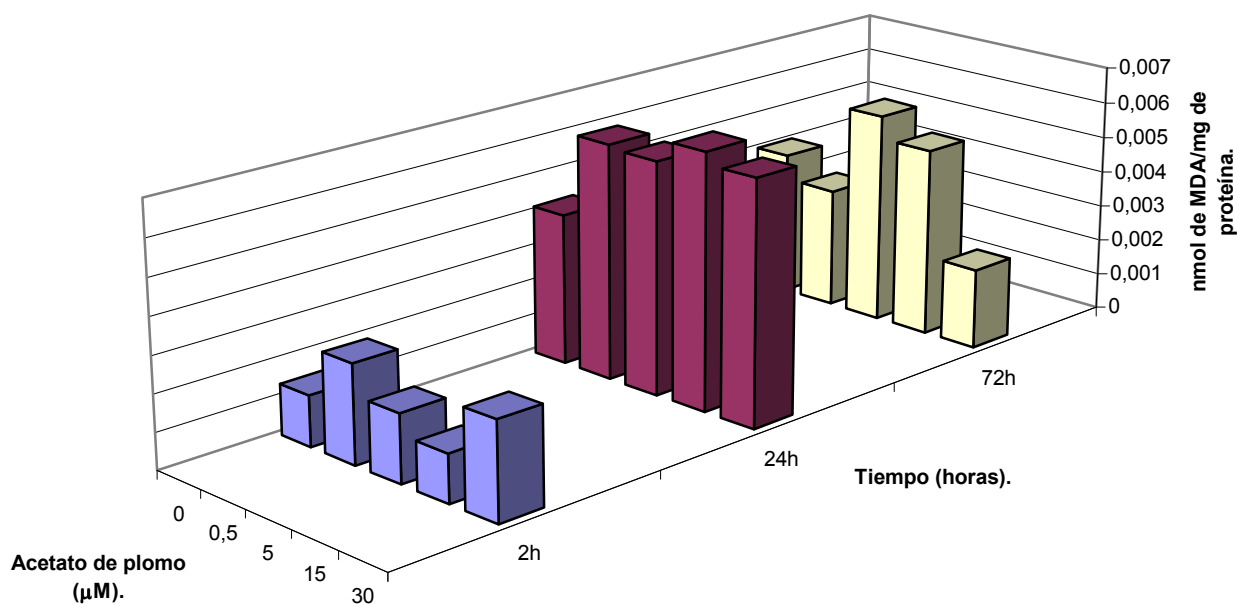
Acetato de Plomo ( $\mu\text{M}$ )	2h	24h	72h
0.5	22.02 $\pm$ 2.72	39.81 $\pm$ 3.74*	26.21 $\pm$ 2.01**
5	55.03 $\pm$ 10.66*	55.51 $\pm$ 7.18**	28.18 $\pm$ 4.91**
15	0 $\pm$ 8.2	10.87 $\pm$ 9.2	16.23 $\pm$ 2.64*
30	55.89 $\pm$ 15.64*	21.5 $\pm$ 14.62	19.69 $\pm$ 1.45**

\*  $p < 0.05$  vs control; \*\*  $p < 0.01$  vs control

En el caso de las células 3T3, la gráfica 2 muestra que la inducción de ERO se presenta desde las concentraciones menores y se mantiene sin mayores cambios a través de las concentraciones y el tiempo de exposición. De tal manera que en la tabla 2 resalta el hecho de que la magnitud de los cambios con respecto a los controles son similares para todos los tiempos de exposición, además de que a la concentración de 15  $\mu\text{M}$  en todos los casos se observan los menores niveles de ERO.

## 7.2 Lipoperoxidación.

Uno de los blancos moleculares de las ERO son los lípidos de membrana, los cuales pueden sufrir oxidaciones que generan lipoperoxidación (Marnett et al, 1999; Valko et al, 2006), este proceso celular se determinó a través de la cuantificación de malonildialdehído (MDA) en los extractos celulares posterior a los tratamientos con acetato de plomo, los resultados de estas determinaciones se muestran en las gráficas 3 y 4, mientras que el porcentaje de inducción de peroxidación lipídica con respecto al control se muestra en las tablas 3 y 4.



**Gráfica 3. Determinación de lipoperoxidación (nmol de MDA/mg de proteína) en células WRL-68 tratadas con acetato de plomo.**

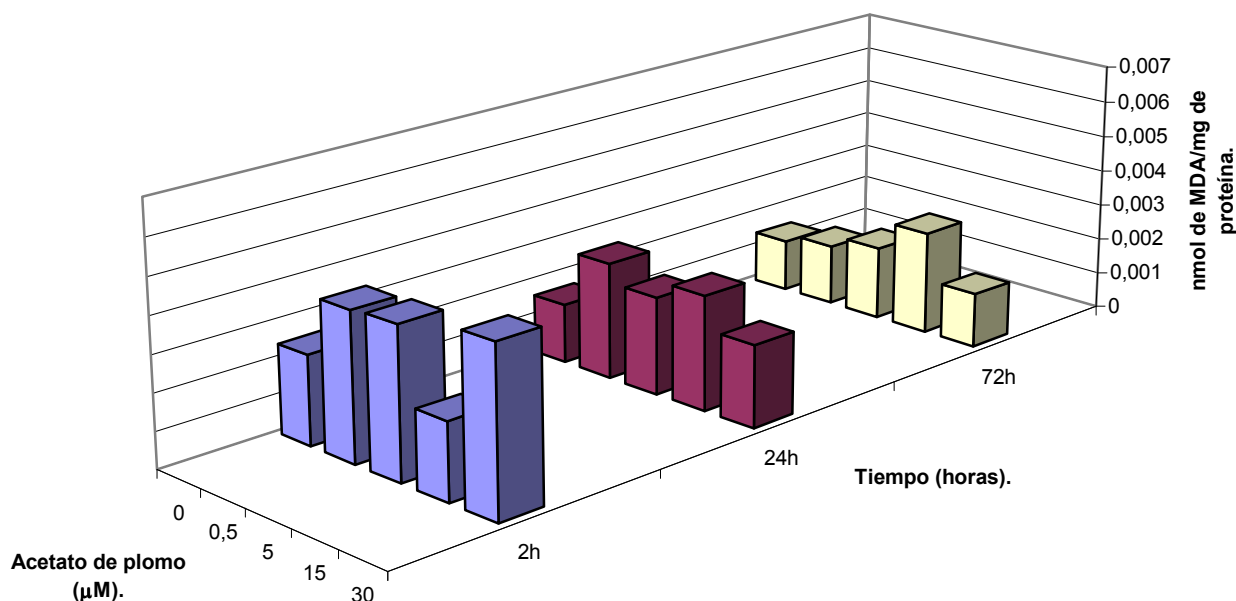
**Tabla3. Porcentaje de lipoperoxidación con respecto al control en células WRL-68 tratadas con acetato de plomo.**

Acetato de Plomo ( $\mu\text{M}$ )	2h	24h	72h
0.5	93.57 $\pm$ 38.48*	55.8 $\pm$ 8.14	0 $\pm$ 56.48
5	33.97 $\pm$ 5.59	53.45 $\pm$ 19.26	45.72 $\pm$ 29.77
15	0 $\pm$ 0.85	72.3 $\pm$ 22.91*	29.92 $\pm$ 8.86
30	91.6 $\pm$ 0.01*	60.42 $\pm$ 15.44	0 $\pm$ 0.55

\*  $p < 0.05$  vs control

Es claro que los niveles de lipoperoxidación basal son menores a las 2 horas de cultivo, así como el diferente comportamiento para cada tipo de exposición, en las células WRL-68. El tratamiento de 2 horas para las células WRL-68 muestra altibajos en el comportamiento con respecto a las concentraciones, mientras que a 24 horas los niveles de MDA tienden a incrementar desde las menores concentraciones y a 72 horas de exposición, nuevamente se observan altibajos. Este mismo comportamiento se describe en la tabla 3, cuando se

comparan las inducciones con respecto a los controles. Si bien, estadísticamente las diferencias solo se muestran en los porcentajes el comportamiento del tratamiento de 24 horas muestra efectos biológicos sobre las membranas celulares.



**Gráfica 4. Determinación de lipoperoxidación (nmol de MDA/mg de proteína) en células 3T3 tratadas con acetato de plomo.**

**Tabla 4. Porcentaje de lipoperoxidación con respecto al control en células 3T3 tratadas con acetato de plomo.**

Acetato de Plomo ( $\mu\text{M}$ )	2h	24h	72h
0.5	65.89 $\pm$ 20.33*	96.11 $\pm$ 3.86*	16.81 $\pm$ 7.39
5	68.65 $\pm$ 8.07*	64.59 $\pm$ 2.72	40 $\pm$ 9.66
15	0 $\pm$ 8.25	93.05 $\pm$ 23.79*	98.45 $\pm$ 20.8**
30	86.77 $\pm$ 3.41**	38.46 $\pm$ 31.87	5.23 $\pm$ 17.68

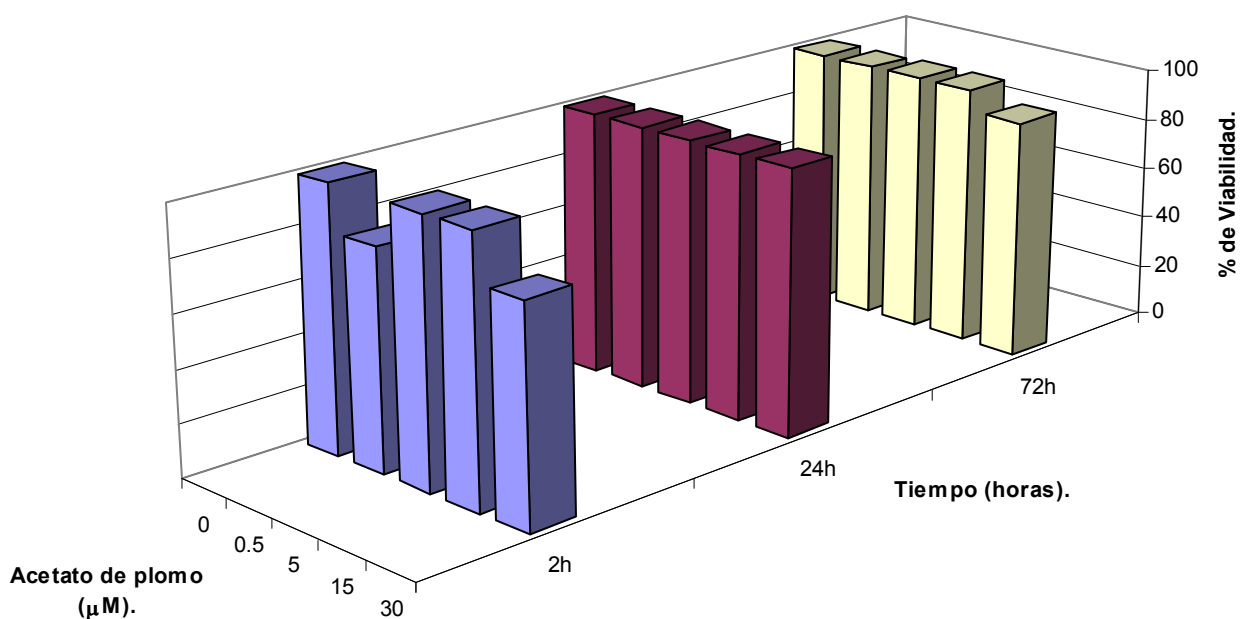
\*  $p < 0.05$  vs control; \*\*  $p < 0.01$  vs control

Es evidente el comportamiento inverso en tendencia que muestran las células 3T3 (gráfica 4) a través del tiempo de exposición con respecto al mostrado por las WRL-68 (gráfica 3). Además, las células 3T3 muestran mayores niveles de

lipoperoxidación en el tratamiento de 2 horas y disminuyen al incrementar los tiempos de exposición. Sin embargo, el mostrar estos resultados en porcentaje con respecto al control (tabla 4), los cambios más significativos biológicamente los presentan las células tratadas durante 24 horas.

### 7.3 Citotoxicidad y Genotoxicidad.

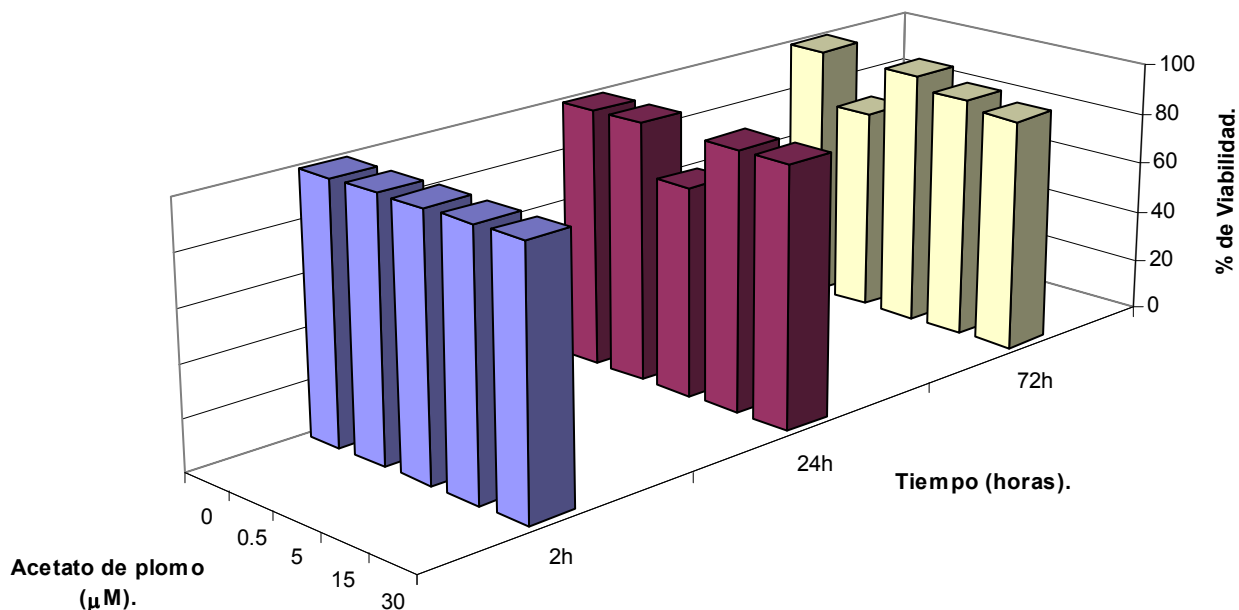
La citotoxicidad se evaluó como el inverso de la viabilidad y ésta última se muestra en las gráficas 5 y 6, para las células WRL-68 y 3T3 respectivamente. Mientras que el porcentaje de citotoxicidad se presenta en las tablas 5 y 6.



**Gráfica 5. Porcentaje de viabilidad determinada en células WRL-68 tratadas con acetato de plomo.**

**Tabla 5. Porcentaje de citotoxicidad con respecto al control en células WRL-68 tratadas con acetato de plomo.**

Acetato de Plomo ( $\mu\text{M}$ )	2h	24h	72h
0.5	17.23+/-11.28	0+/-1.81	0+/-6.49
5	0+/-1.77	0+/-3.98	0+/-3.19
15	0+/-7.33	0+/-14.52	0+/-7.09
30	18.15+/-4.43	0+/-14.31	8.18+/-7.27



**Gráfica 6. Porcentaje de viabilidad determinada en células 3T3 tratadas con acetato de plomo.**

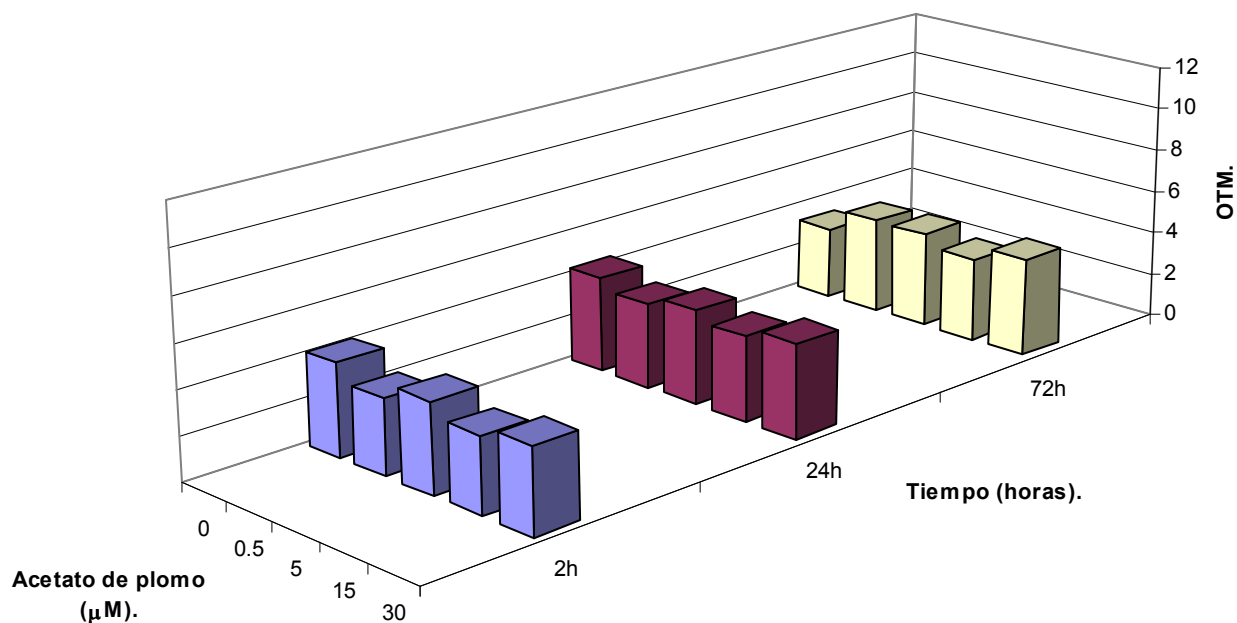
**Tabla 6. Porcentaje de citotoxicidad con respecto al control en células 3T3 tratadas con acetato de plomo.**

Acetato de Plomo (μM)	2h	24h	72h
0.5	0+/-9.52	0+/-13.32	20.72+/-4.85
5	0+/-10.27	19.81+/-10.73	0.75+/-5.92
15	0+/-0.54	0+/-12.8	5.75+/-13.86
30	0+/-6.4	0+/-5.43	9.34+/-9.2

Es evidente que los tratamientos de acetato de plomo 0.5, 5, 15 y 30 μM no son citotóxicos para ambas líneas celulares, WRL-68 y 3T3 tratadas durante 2, 24 y 72 horas, hecho que sitúa a nuestras exposiciones dentro del rango de no-citotóxicas.

La genotoxicidad se evaluó a través del ensayo cometa o electroforesis unicelular y los resultados se expresan como el momento de la cola, tal como se describe en la metodología. Los resultados de genotoxicidad obtenidos por

la exposición a plomo de líneas celulares se reportan en las gráficas 7 y 8, mientras que el porcentaje de genotoxicidad con respecto a los controles se muestra en las tablas 7 y 8 para las líneas WRL-68 y 3T3 respectivamente.

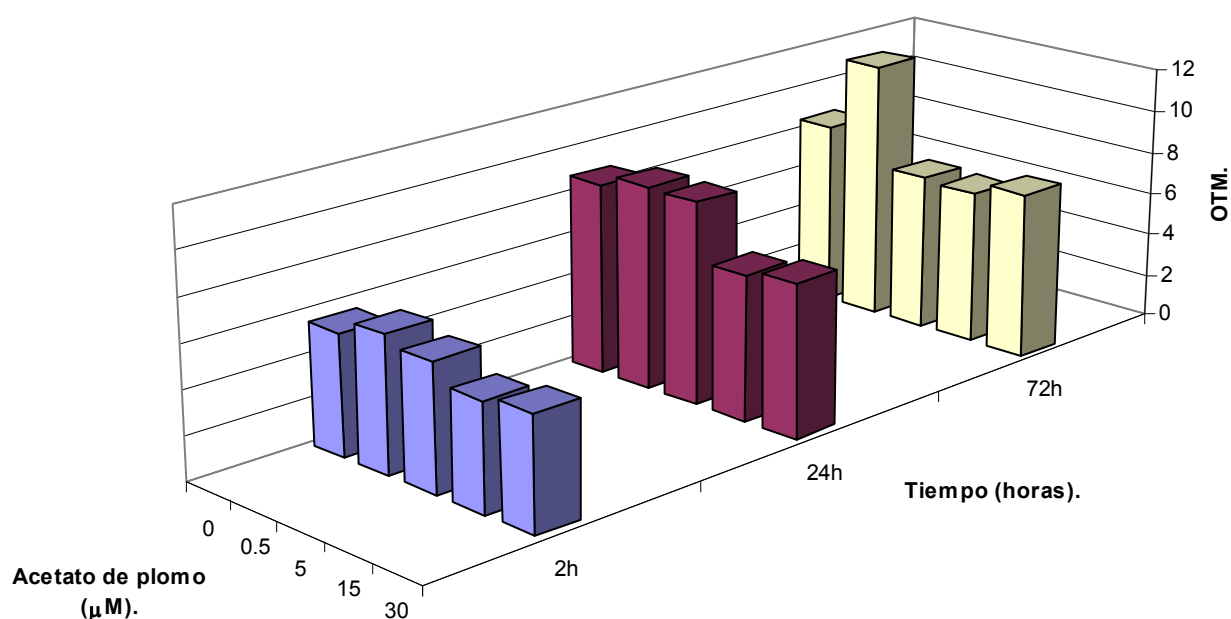


**Gráfica 7. Genotoxicidad (Olive Tail Moment) determinada en células WRL-68 tratadas con acetato de plomo.**

**Tabla 7. Porcentaje de genotoxicidad con respecto al control en células WRL-68 tratadas con acetato de plomo.**

Acetato de Plomo (μM)	2h	24h	72h
0.5	0±13.44	0±16.21	33.03±9.55*
5	0±10.87	0±17.91	33.23±8.95*
15	0±13.25	0±28.15	17.07±8.57
30	0±10.77	0±14.52	37.95±9.8*

\* p < 0.05 vs control



**Gráfica 8. Genotoxicidad (Olive Tail Moment) determinada en células 3T3 tratadas con acetato de plomo.**

**Tabla 8. Porcentaje de genotoxicidad con respecto al control en células 3T3 tratadas con acetato de plomo.**

Acetato de Plomo (μM)	2h	24h	72h
0.5	12.25±/8.08	6.07±/8.34	42.52±/6.1**
5	5.31±/7.87	5.62±/7.36	0±/6.58
15	0±/9.18	0±/7.42	0±/6.15
30	0±/8.21	0±/6.79	0±/5.92

\*\* p< 0.01 vs control

Los efectos genotóxicos para las células WRL-68 son nulos por la exposición a acetato de plomo, aunque como se muestra en la tabla 7, hay una tendencia a incrementar dichos efectos en los tratamientos de 72 horas. En cuanto a la genotoxicidad de las células 3T3, esta tiene algunos efectos leves a las concentraciones menores, aunque estadísticamente no son significativos. En este mismo tipo celular los niveles genotóxicos basales son mayores que los de las células WRL-68.



#### 7.4 Correlación entre las generación de ERO con la cito y genotoxicidad.

Como objetivo principal de este trabajo nos propusimos determinar si las ERO producidas por la exposición a plomo eran las responsables del daño cito y genotóxico generados en las líneas celulares WRL-68 y 3T3, para lo cual se realizaron análisis de correlación simple de Pearson, considerándolas significativas si  $p < 0.05$ . De tal manera que se busco la correlación entre los niveles de radicales libres y el efecto biológico sobre membranas celulares, cuyos resultados se resumen en la tabla 9 para las células WRL-68 y en la tabla 10 para las 3T3.

**Tabla 9. Correlación entre ERO y los niveles de lipoperoxidación en células WRL-68.**

Tiempo (horas)	R	p	significancia
2	0.7892	0.1125	ns
24	0.6549	0.2303	ns
72	0.782	0.1181	ns

r= coeficiente de correlación, p=valor de probabilidad

**Tabla 10. Correlación entre ERO y los niveles de lipoperoxidación en células 3T3.**

Tiempo (horas)	R	p	Significancia
<b>2</b>	<b>0.9367</b>	<b>0.019</b>	<b>*</b>
24	0.4987	0.3925	ns
72	0.2058	0.7398	ns

r= coeficiente de correlación, p=valor de probabilidad, \*  $p < 0.05$

Cabe la pena mencionar que no hubo correlación entre estas variables en las células WRL-68, mientras que para las 3T3 solo fue positiva para el tratamiento de 2 horas. Buscando la dependencia entre los niveles de especies reactivas de oxígeno que denota estrés y la citotoxicidad, las correlaciones se muestran en las tablas 11 y 12 para las líneas WRL-68 y 3T3.

**Tabla 11. Correlación entre los niveles de ERO y la citotoxicidad en células WRL-68.**

Tiempo (horas)	R	p	significancia
2	0.73	0.1614	ns
24	0.7043	0.1843	ns
72	0.5458	0.3413	ns

r= coeficiente de correlación, p=valor de probabilidad

**Tabla 12. Correlación entre los niveles de ERO y la citotoxicidad en células 3T3.**

Tiempo (horas)	R	p	Significancia
2	0.1465	0.8142	ns
24	0.553	0.3336	ns
72	0.4814	0.4116	ns

r= coeficiente de correlación, p=valor de probabilidad

En ambas líneas celulares no fue posible establecer una correlación entre estas variables para cada uno de los tiempos de exposición. Este mismo tipo de análisis se realizó para determinar la dependencia entre la inducción de radicales libres y los niveles de genotoxicidad, cuyos resultados se resumen en las tablas 13 y 14.

**Tabla 13. Correlación entre los niveles de ERO y la genotoxicidad en células WRL-68.**

Tiempo (horas)	R	p	significancia
2	0.0438	0.9443	ns
<b>24</b>	<b>0.9041</b>	<b>0.0351</b>	<b>*</b>
72	0.0508	0.9354	ns

r= coeficiente de correlación, p=valor de probabilidad, p< 0.05

**Tabla 14. Correlación entre los niveles de ERO y la genotoxicidad en células 3T3.**

Tiempo (horas)	R	p	Significancia
2	0.361	0.5506	ns
24	0.5194	0.3697	ns
72	0.1941	0.7544	ns

r= coeficiente de correlación, p=valor de probabilidad

En las células WRL-68 se determinó una correlación inversa entre los niveles de ERO y la genotoxicidad solo en el tratamiento de 24 horas. Mientras que para las células 3T3 no fue posible establecer alguna correlación.

### 7.5 Correlación entre lipoperoxidación, citotoxicidad y genotoxicidad.

Tomando en cuenta que dentro de nuestros objetivos planteamos la necesidad de observar que papel desempeñaban las ERO en el daño cito y genotóxico, surgió la necesidad de realizar las correlaciones entre los demás parámetros evaluados con el fin de precisar si entre estos eventos existía una relación. A continuación mostramos en las siguientes tablas los resultados de estas correlaciones por tipo celular.

**Tabla 15. Correlación entre Lipoperoxidación y Citotoxicidad en células WRL-68.**

Tiempo (horas)	R	P	significancia
2	<b>0.9071</b>	<b>0.0335</b>	*
24	0.7846	0.116	ns
72	0.3974	0.5077	ns

r= coeficiente de correlación, p=valor de probabilidad

**Tabla 16. Correlación entre Lipoperoxidación y Citotoxicidad en células 3T3.**

Tiempo (horas)	R	P	Significancia
2	0.084	0.8932	ns
24	0.0858	0.891	ns
72	0.1337	0.8303	ns

r= coeficiente de correlación, p=valor de probabilidad

**Tabla 17. Correlación entre Lipoperoxidación y Genotoxicidad en células WRL-68.**

Tiempo (horas)	R	P	significancia
2	0.2917	0.6339	ns
24	0.5792	0.3062	ns
72	0.2512	0.6836	ns

r= coeficiente de correlación, p=valor de probabilidad

**Tabla 18. Correlación entre Lipoperoxidación y Genotoxicidad en células 3t3.**

Tiempo (horas)	R	P	Significancia
2	0.458	0.4379	ns
24	0.0705	0.9103	ns
72	0.4032	0.501	ns

r= coeficiente de correlación, p=valor de probabilidad

**Tabla 19. Correlación entre Citotoxicidad y Genotoxicidad en células WRL-68.**

Tiempo (horas)	R	P	significancia
2	0.0109	0.9862	ns
24	0.6831	0.2037	ns
72	0.1367	0.8265	ns

r= coeficiente de correlación, p=valor de probabilidad

**Tabla 20. Correlación entre Citotoxicidad y Genotoxicidad en células 3T3.**

Tiempo (horas)	R	P	Significancia
2	0.4423	0.4558	ns
24	0.497	0.3943	ns
72	0.8215	0.0881	ns

r= coeficiente de correlación, p=valor de probabilidad

Al realizar estas correlaciones solo se obtuvo un resultado positivo entre la lipoperoxidación y la citotoxicidad en la línea WRL-68 a 2 horas.

## VIII. DISCUSION

La capacidad del plomo para generar ERO como mecanismo de toxicidad ha sido documentada ampliamente (Hermes-Lima et. al., 1991, Klein et. al., 1991, Ariza et. al., 1998, Yang, et. al., 1999; Valverde et al., 2001). Con base en ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar si la exposición a concentraciones equimolares a las determinadas en trabajadores ocupacionalmente expuestos producía especies reactivas de oxígeno en células hepáticas humanas inmortalizadas (WRL-68) y fibroblastos murinos transformados (3T3).

En el presente trabajo, la generación de ERO por la exposición a acetato de plomo en las células WRL-68 se observa desde tratamientos por 2 horas, tendiendo a disminuir para las exposiciones de 24 y 72 horas (tabla 1). Sin embargo, la exposición a  $5\mu\text{M}$ , equivalente a la que circula en los trabajadores ocupacionalmente expuestos (Palus et al, 2003), muestra un comportamiento inverso, es decir, la generación de ERO es mayor al incrementar el tiempo de exposición (gráfica 1). Estos resultados sugieren que en este modelo celular hepático, se presenta un metabolismo alto, las ERO se generan por exposiciones de corta duración, lo cual desencadena procesos celulares que contrarrestan la permanencia de dichas especies reactivas, y en parte podría deberse a la actividad de algunos antioxidantes endógenos (Gurer et al., 1999). En la línea celular 3T3, se produjeron ERO de manera similar para todos los tiempos de exposición, la excepción fue la exposición de 2 horas a  $15\mu\text{M}$  de acetato de plomo, donde se determinó una disminución de las especies reactivas. Sin embargo, es notorio (gráfica 2) que los mayores incrementos se presentaron en las concentraciones menores ( $0.5$  y  $5\mu\text{M}$ ), lo cual es muy

significativo, puesto que son los niveles de exposición presentes tanto en individuos control como en los ocupacionalmente expuestos (Palus et al, 2003). Estos resultados sugieren que los efectos generados por la exposición al metal, son diferentes para cada modelo celular, dado que en los fibroblastos murinos (3T3) los niveles de ERO tienden a ser mayores a través del tiempo de exposición. Si bien, el comportamiento de estos fibroblastos va mas de acuerdo al mecanismo de toxicidad propuesto por varios autores (Ariza et al., 1998; Gurer et al., 1999; Gurer y Ercal, 2000), ésta claro que los efectos ocasionados en los hepatocitos humanos (WRL-68) son más representativos de los procesos que pueden presentarse en los individuos expuestos, ya que el hecho de la transformación de los fibroblastos pudiera estar acentuando procesos celulares independientes de la exposición al metal.

Los efectos celulares ocasionados por las ERO son numerosos, sin embargo, sus blancos moleculares son los lípidos, proteínas y ADN (Halliwell, 1999, Gurer y Ercal 2000). Es en este sentido que se determinó la generación de MDA, puesto que es el principal producto de la reacción entre las ERO con los lípidos de membrana (Halliwell 1999; Gurer y Ercal 2000; Valko et al., 2006). En las células hepáticas humanas, los efectos sobre los lípidos de membrana desencadenados indirectamente por la exposición a plomo, fueron muy escasos (tabla 3 y gráfica 3), sin embargo, algunos de los tratamientos que mostraron efectos estadísticamente significativos coinciden con los estadísticamente significativos para la generación de ERO (tabla 1). Este resultado sugiere que las ERO son contrarrestadas en algunos casos, puesto que no se observó un efecto biológico desencadenado por estas en las células hepáticas humanas. En cuanto a los fibroblastos murinos, los efectos inducidos

sobre los lípidos de membrana muestran mayores efectos para el tratamiento mas corto (2 horas) y tienden a disminuir a través del tiempo de exposición (gráfica 4). Este comportamiento sugiere que los niveles de exposición al metal desencadenan procesos celulares de desintoxicación, puesto que hay una relación inversa entre los niveles de ERO que incrementan, mientras que los niveles de MDA disminuyen a través del tiempo de exposición. Es decir, si el censado de ERO como inductoras de estrés oxidativo se da desde las 2 horas de exposición, se inducen procesos celulares para contrarrestar sus efectos sobre biomoléculas, es por ello que a través del tiempo los niveles de peroxidación lipídica son menores aunque haya más ERO. Este fenómeno va de acuerdo a lo propuesto por Gurer y Ercal (2000), quienes señalan que incrementos de MDA inducen antioxidantes como el glutati6n y la catalasa. Es importante mencionar que al comparar los niveles de lipoperoxidaci6n entre los modelos celulares se observan menores niveles en los fibroblastos murinos, comparados con los hepatocitos humanos, lo cual pone en evidencia las diferencias metab6licas entre estos(<http://club.telepolis.com/ohcop/094b.html>).

El presente trabajo propone la generaci6n de estr6s oxidativo como el principal mecanismo de toxicidad del plomo, a trav6s de cual se generan da6os cito y genot6xicos (figura 7). Este planteamiento surgi6 de las propuestas generadas por varios autores (Winder y Bonin, 1993; Jonson, 1998; Yusof et al., 1999; Gurer y Ercal, 2000; Valverde et al., 2002; Fracasso et al., 2002; Silbergeld, 2003), sin embargo, la importancia de nuestra propuesta radica en realizar exposiciones equiparables a las que se presentan en personas expuestas. Estas concentraciones no causaron un efecto citot6xico del plomo bajo los esquemas de exposici6n de 2, 24 y 72 horas (tabla 5 y 6), en ambas l6neas

celulares, lo cual es una ventaja para evidenciar mas claramente los posibles mecanismos de acción del plomo ya que se ha observado que algunos de los parámetros utilizados en este estudio se pueden ver modificados cuando se presenta una gran toxicidad. Esto explica en parte porque los efectos de estrés oxidativo, como los niveles de ERO y MDA no fueron tan evidentes como en otros estudios (Ariza et al, 1998; Yang et al, 1999; Yiin et al., 1978; Sandhir y Gill, 1995).

Otro blanco molecular de las ERO, es el ADN (Halliwell, 1999), en el cual se determinó la presencia de rompimientos de cadena sencilla con la finalidad de evidenciar daño genotóxico inducido indirectamente por la exposición al metal.

La exposición a plomo en concentraciones semejantes a las de POE en las células WRL-68 solamente inducen genotoxicidad con respecto al control a las 72 horas de exposición (tabla 7), esto nos sugiere que la cronicidad de la exposición a plomo es un factor importante para el establecimiento de daño al ADN en esta línea celular. Si bien estamos observando que la producción de ERO se ve disminuida a 72 horas al igual que la lipoperoxidación, no podemos descartar la posibilidad de que las ERO o el MDA podrían ser los causantes de la genotoxicidad, puesto que las ERO tienen la capacidad de oxidar al ADN y el MDA ha mostrado tener capacidades genotóxicas (Marnett et al, 1999; Ariza et al., 1998; Valko et al., 2006). En el caso de las células 3T3 el daño al ADN basal es mayor que en las células WRL-68 lo cual podría deberse a una mayor sensibilidad por parte de los fibroblastos, ya que estos al estar transformados tienen una cierta inestabilidad en su ADN ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). Además es importante señalar que los efectos genotóxicos se observaron en las concentraciones menores (0.5 y 5  $\mu$ M) y las tendencias a disminuir al



exponerse a las concentraciones mayores pudiera deberse a un efecto entrecruzador, propuesto por algunos autores (Silbergeld, 2003; Wozniak y Blasiak, 2003). No fue posible establecer una relación entre los niveles de ERO y MDA con la generación de daño cito y genotóxico por la exposición a plomo, tal como se muestra en las tablas 9 – 14. Si bien los resultados obtenidos en este trabajo no evidencian de manera contundente que la producción de ERO sea el mecanismo de acción por el cual el plomo cause daño tanto citotóxico como genotóxico a concentraciones equivalentes a las de personas ocupacionalmente expuestas, la importancia de estos resultados radica en el planteamiento de interrogantes enfocados a esclarecer los posibles mecanismos de acción por los cuales el plomo causa efectos adversos sobre la salud e incluso su carcinogenicidad en este sector de la población. Los resultados en hepatocitos humanos con alta actividad metabólica como las WRL-68, sugieren que una exposición crónica es necesaria para observar daño genotóxico, el cual muy probablemente sea debido a la generación de ERO y el abatimiento de la defensa antioxidante estableciendo un estrés oxidativo, tal como se ha propuesto por algunos autores (Gurer et al., 1999; Gurer y Ercal, 2000; Ariza et al., 1998). Sin embargo, nuestros datos no pueden descartar que existan otras explicaciones para la generación de este daño como pueden ser; la interacción directa del metal con el ADN o con proteínas asociadas a este (Valverde et al., 2001); o la inhibición de la reparación del ADN (Hartwig, 1998; Hartwig y Schwerdtle, 2002) también descrita como mecanismos de carcinogenicidad del plomo o incluso la posibilidad de buscar otros mecanismos de acción observados a estas concentraciones, que no hayan sido descritos antes en los estudios realizados a concentraciones altas.

## IX. CONCLUSIONES

**Con respecto a los objetivos planteados en este trabajo, encontramos que:**

- El plomo a concentraciones similares a las encontradas en POE (0, 0.5, 5,15 y 30  $\mu\text{M}$ ) no genera ERO en las líneas celulares WRL-68 y 3T3 tras exposiciones de 2, 24 y 72 horas.
- La exposición a plomo por 2, 24 y 72 horas, no generó lipoperoxidación en los modelos celulares empleados a las concentraciones de 0, 0.5, 5,15 y 30  $\mu\text{M}$ .
- La cito y genotoxicidad fueron negativas en las líneas WRL-68 y 3T3 expuestas a plomo.
- Las ERO generadas por la exposición a plomo no mostraron tener una relación con el daño citotóxico y genotóxico determinado en ambas líneas celulares.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Ariza ME, Bijur GN, Williams MV. Lead and mercury mutagenesis: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. *Environ Mol Mutagen*; 31:352-361. (1998)

Ariza M, Bijur GN, Williams M. Environmental Metal Pollutants Reactive Oxygen Intermediaries AND Genotoxicity: Molecular Approaches to Determine Mechanisms of Toxicity. Ed. Kluwer Academic Publishers. EE.UU.A (1999)

Apostoli P, Bellini A, Porru S, Bisanti L.; The effect of lead on male fertility: a time to pregnancy (TTP) study. *Am J Ind Med*; 38(3):310-5. (2000)

ATSDR. Toxicological Profile for Lead. U.S. DHHS, PHS, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <http://atsdr.cdc.gov/tfacts13.html>. (1999)

Basaran N, Undeger U. Effects of lead on immune parameters in occupationally exposed workers. *Am J Ind Med*; 38(3):349-54. (2000)

Castilla R, Gonzalez R, Fouad D, Fraga E, Muntane J. Dual effect of ethanol on cell death in primary culture of human and rat hepatocytes. *Alcohol Alcohol*; 39(4):290-6. (2004)

Calderon-Salinas JV, Quintanar-Escorcia MA, Gonzalez-Martinez MT, Hernandez-Luna CE. Effect of lead on the calcium transport in human erythrocyte. *Hum Exp Toxicol*; 18(3):146-53. (1999)

Diaz-Barriga F, Batres L, Calderon J, Lugo A, Galvao L, Lara I, Rizo P, Arroyave ME, McConnell R. El Paso smelter 20 years later: residual impact on Mexican children. *Environ Res*; 74(1):11-6. (1997)

Fernandez-Cabezudo MJ, Hasan MY, Mustafa N, El-Sharkawy RT, Fahim MA, Al-Ramadi BK.. Alpha tocopherol protects against immunosuppressive and immunotoxic effects of lead. *Free Radic Res*; 37(4):437-45 (2003)

Fracasso ME, L. Perbellini, S. Solda, G. Talamini, P. Franceschetti. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. *Mutat Res*; 515:159-169. (2002)

Gracia-García D. Genotoxicidad del plomo: alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN en personas ocupacionalmente expuestas (POE). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM (2005)

Gurer H, Ozgunes H, Oztezcan S, Ercal N. Antioxidant role of alpha-lipoic acid in lead toxicity. *Free Radic Biol Med*; 27(1-2):75-81. (1999)

Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med*. Review; 15;29(10):927-45. (2000)

Goyer RA. Lead toxicity: current concerns. *Environ Health Perspect Review*; 100:177-87. (1993)

Halliwell B, Gutteridge M. en; "Free Radicals in Biology and Medicine"; Ed Oxford Science Publications; UK, (1999)

Hartwig A, Schlepegrell R, Beyersmann D. Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutat Res*; 241:75-82 (1990)

Hartwig A. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ Health Perspect*; 102 Suppl 3:45-50. (1994)

Hartwig A. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition; *Toxicol Lett*; 28: 102-103:235-9.(1998)

Hartwig A, Schwerdtle T. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett*; 127:47-54. (2002)

Hermes-Lima, M., B. Pereira, and E.J. Bechara. Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica*; 21:1085-1090. (1991)

Hernberg S. Lead poisoning in a historical perspective. *Am J Ind Med. Review*; 38(3):244-54. (2000)

<http://www.atcc.org>

[http:// www.bendest.com/lifeex/aging.html](http://www.bendest.com/lifeex/aging.html)

[http:// www.cepis.ops-oms.org/tutorial/casos/caso3/plom.html](http://www.cepis.ops-oms.org/tutorial/casos/caso3/plom.html)

<http://club.telepolis.com/ohcop/094b.html>

[http:// www.comexperu.org.pe](http://www.comexperu.org.pe)

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans--Lead and Lead Compounds: Lead and Inorganic Lead Compounds (Group 2b) Organolead Compounds (Group 3b), Supplement 7. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. 230-232 pp. (1987)

Johnson FM.. The genetic effects of environmental lead. *Mutat Res*; 410:123-140. (1998)

Kajiwara Y, Ajimi S. Verification of the BALB/c 3T3 cell transformation assay after improvement by using an ITES-medium. *Toxicology in Vitro*; 17 489-496. (2003)

Klein CB, K. Frenkel, M. Costa. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*; 4:592-604. (1991)

Klaassen CD, Watkins III JB. Cassarett & Doull's, Toxicology, The basic science of poison. Fifth Edition. McGraw Hill. USA. pp861. (1999)

Lee VM, Quinn PA, Jennings SC, Ng LL. NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models. *Hypertension*; 41(4):925-31. (2003)

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*; 424: 83-95. (1999)

Mendoza O.S. Análisis de la relación entre los niveles de plomo en sangre, protoporfirinas eritrocitarias libres y aberraciones cromosómicas en mujeres puerperas y sus productos. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias, UNAM. (1996)

Nordberg M, Winblad B, Fratiglioni L, Basun H. Lead concentrations in elderly urban people related to blood pressure and mental performance: results from a population-based study. *Am J Ind Med*; 38(3):290-4. (2000)

Palus J, Rydzynski K, Dziubaltowska E, Wyszynska K, Natarajan AT, Nilsson R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res*; 9;540(1):19-28. (2003)

Pierce Chemical Company. BCA Protein Assay Reagent, Technical Bulletin 23225, Rockfors, I11.(1984)

Quintanilla-Vega B, Hoover DJ, Bal W, Silbergeld EK, Waalkes MP, Anderson LD. Lead interaction with human protamine (HP2) as a mechanism of male reproductive toxicity. *Chem Res Toxicol*; 13(7):594-600. (2000)

Rabinowitz MB, GW Wetherill, JD Kopple. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest*; 58:260-270. (1976)

Report on carcinogens background document for lead and lead compounds, Department of Health and Human Services. (2003)

Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl. Review*; 5;722(1-2):225-54. (1999)

Rubio C. Gutiérrez AJ. Martín-Izquierdo RE. Revert C. Lozano G y Hardisson A. El plomo como contaminante alimentario. *Rev. Toxicol*; 21:72-80. (2004)

Sandhir R, Gill D. Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biol. Trace Elem. Res*; 48:91-97. (1995)

Silbergeld EK, M Waalkes, JM Rice. Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *Am J Ind Med*; 38:316-323. (2000)

Silbergeld EK. Facilitative mechanism of lead as a carcinogen. *Mutation Research*; 533:121–133 (2003)

Skerfving S. Biological monitoring of exposure to inorganic lead. En Clarkson T.W. L Friberg, GF Nordberg y PR Sager. Biological monitoring of toxic metals. Plenum Press, New York, USA pp 169-197 (1988)

Smirnov I, RH Shafer. Lead is unusually effective in sequence-specific folding of DNA. *J Mol Biol*; 296:1-5. (2000)

Snyder RD, GF Davis, PJ Lachmann. Inhibition by metals of X-ray and ultraviolet-induced DNA repair in human cells. *Biol Trace Elem Res*; 21:389-398. (1989)

Strauss GH. Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat Res*; 252(1):1-15. (1991)

Stromberg U, Lundh T, Schutz A, Skerfving S. Yearly measurements of blood lead in Swedish children since 1978: an update focusing on the petrol lead free period 1995-2001. *Occup Environ Med*; 60(5):370-2. (2003)

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact. Review*; 10;160(1):1-40. (2006)

Valverde M, Trejo C, Rojas E. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction?. *Mutagenesis*; 16(3): 265-270. (2001)

Valverde M, TI Fortoul, F Díaz-Barriga, J Mejía, ER del Castillo. Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. *Mutagenesis*; 17:55-61. (2002)

Waalkes MP, BA Diwan, JM Ward, DE Devor, RA Goyer. Renal tubular tumors and atypical hyperplasias in B6C3F1 mice exposed to lead acetate during gestation and lactation occur with minimal chronic nephropathy. *Cancer Res*; 55:5265-5271. (1995)

Winder C, T Bonin.. The genotoxicity of lead. *Mutat Res*; 285:117-124. (1993)

Wozniak K, Blasiac J. In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA- protein cross-links. *Mutat Res*; 535:127-39. (2003)

Yang JL. LC Wang, CY Chang, TY Liu. Singlet oxygen is the major species participating in the induction of DNA strand breakage and 8-

hydroxydeoxyguanosine adduct by lead acetate. *Environ Mol Mutagen*; 33:194-201. (1999)

Yiin SJ, Lin TH. Lead-catalyzed peroxidation of essential unsaturated fatty acid. *Biol Trace Elem. Res*; 50:167-172. (1995)

M Yusof, D Yildiz, N Ercal. N-Acetyl-L-cysteine protects against delta-aminolevulinic acid-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *Toxicol Lett*; 106 (1) 41-47. (1999)

Zelikoff JT, JH Li, A Hartwig, XW Wang, M Costa, TG Rossman. Genetic toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis*; 9:1727-1732. (1988)