



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LA INTOXICACIÓN POR PLOMO EN LOS METABOLITOS DE LA
VÍA DE LA KINURENINA: POSIBLE IMPACTO EN LA MEMORIA Y
APRENDIZAJE EN RATONES WILD-TYPE Y KNOCK-OUT PARA LA
KINURENINA AMINOTRANSFERASA II

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. DANIELA RAMÍREZ ORTEGA

DRA. VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ

[Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía](#)

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

[Instituto de Ciencias Biomédicas](#)

DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2020



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.

Ramírez Ortega Daniela
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 09 de marzo del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Efecto de la intoxicación por plomo en los metabolitos de la vía de la kinurenina: posible impacto en la memoria y aprendizaje en ratones wild-type y knock-out para la kinurenina aminotransferasa II**", dirigida por el/la Dr(a). **Pérez de la Cruz Verónica**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Rojas del Castillo Emilio
VOCAL	Manoutcharian Airapetian Karen
VOCAL	Roldán Roldán Gabriel
VOCAL	Carrillo Mora Paul
SECRETARIO	Reyes Vivas Horacio

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 09 de marzo de 2020



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

- ✚ A la Dra. Verónica Pérez de la Cruz por la guía durante la realización de este proyecto.
- ✚ A la Dra. Dinora González por el aprendizaje brindado a lo largo de este trabajo.
- ✚ Al Dr. Benjamin Pineda por los comentarios hechos durante la evaluación periódica de este trabajo.
- ✚ A mi comité de evaluación del Doctorado: Dr. José Pedraza y Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt que fueron de gran apoyo en la retroalimentación de este trabajo.
- ✚ A los doctores que formaron parte del sínodo, por sus comentarios a este escrito y su tiempo brindado.
- ✚ Al apoyo recibido por CONACyT.
- ✚ Al apoyo brindado por parte del “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP) por el apoyo brindado para la asistencia a congresos internacionales.

Efecto de la intoxicación por plomo en los metabolitos de la vía de la kinurenina: posible impacto en la memoria y aprendizaje en ratones wild-type y knock-out para la kinurenina aminotransferasa II

Índice

Agradecimientos	3
Índice	4
Abreviaturas	7
Resumen	10
Abstract	12
Introducción	14
Plomo	14
Efectos del plomo en la cognición en humanos y modelos animales	16
Estrés oxidante	18
Vía de las kinureninas.....	21
Kinurenina aminotransferasa (KAT)	22
Ácido kinurénico.....	23
Ratones knock-out para la KAT II	24
Justificación	26
Hipótesis	27
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28
Métodos	29
Animales	29
Formación de grupos.....	29
Determinación de niveles de plomo en regiones cerebrales.....	29
Pruebas de actividad motora	30
Prueba de alimento enterrado	30
Tratamiento de tejidos	31
Cuantificación de especies reactivas del oxígeno (ERO)	31
Determinación de peroxidación de lípidos (PL)	32
Estimación de la funcionalidad celular (MTT)	32

Cuantificación de proteína por Lowry	32
Determinación de TRP	33
Determinación de KYNA	33
Determinación de L-KYN	33
Determinación de 3-HK	34
Evaluación de la actividad de IDO	34
Evaluación de la actividad de KAT	34
Evaluación de la actividad de KMO	35
Cuantificación de niveles de GSH	35
Estadística.....	35
Resultados.....	37
Consumo de agua	37
Determinación de plomo en regiones cerebrales de ratones intoxicados con AcPb durante la lactancia	37
Efecto del plomo en la actividad motora de ratones intoxicados durante el período de lactancia	38
Efecto del plomo en marcadores de daño celular en tejidos de ratones intoxicados durante la lactancia	39
Efecto del plomo en los niveles de los metabolitos de la VK en ratones intoxicados con 500 ppm de AcPb en período de lactancia	41
Efecto del plomo en la actividad de las enzimas la VK en ratones intoxicados con 500 pm de AcPb en período de lactancia	42
Determinación de plomo en regiones cerebrales de ratones KO KAT II	44
Efecto del plomo en la actividad motora de ratones KO KAT II intoxicados durante el período de lactancia.....	44
Efecto del plomo en marcadores de daño celular en tejidos de ratones KO KAT II.....	45
Efecto del plomo en los niveles de los metabolitos de la VK en ratones KO KAT II intoxicados con 500 pm de AcPb en período de lactancia	47
Efecto del plomo en la actividad de las enzimas la VK en ratones KO KAT II intoxicados con 500 pm de AcPb en período de lactancia	48
Efecto a largo plazo de la intoxicación por plomo durante la etapa de lactancia a los 60 días de	

edad de ratones WT	49
Efecto del plomo en la actividad motora de ratones de 60 DPN intoxicados durante la etapa de lactancia	50
Efecto en memoria y aprendizaje de ratones WT intoxicados con plomo durante la etapa de lactancia	50
Efecto de la intoxicación con plomo durante la lactancia sobre la producción de EROs, PL, funcionalidad celular y niveles de GSH en ratones WT de 60 DPN	51
Efecto de la intoxicación por plomo a largo plazo durante la lactancia sobre los niveles de los metabolitos de la VK en ratones WT de 60 DPN	54
Efecto a largo plazo del plomo sobre la actividad de las enzimas de la VK en ratones WT de 60 DPN intoxicados durante el período de lactancia	54
Discusión	56
Conclusiones	60
Bibliografía	60

Abreviaturas

- **μg** Microgramos
- **μl** Microlitros
- **•OH** Radical hidroxilo
- **¹O₂** Oxígeno singulete
- **3-HA** Ácido 3-hidroxiantranílico
- **3-HAO** Ácido 3-hidroxiantranílico dioxigenasa
- **3-HK** 3-hidroxikinurenina
- **aa.** Aminoácido
- **AcPb** Acetato de plomo
- **ADN** Ácido desoxirribonucleico
- **AMPc** Adenosín monofosfato cíclico
- **ATP** Adenosin trifosfato
- **BFLT** Burried food location test (prueba de alimento enterrado)
- **BSA** Albúmina de suero bovino
- **CaCl₂** Cloruro de calcio
- **Cu(SO₄)₃** Sulfato de cobre
- **DCF** Dicloro-fluoresceína
- **DCF-DA** 2',7'-dichlorodihidrofluoresceína diacetato
- **DCT1** Transportador de moléculas divalentes catiónicas 1
- **dL** Decilitros
- **DMT1** Transportador de metales divalentes catiónicas 1
- **DPN** Días posnatal
- **EDTA** Ácido etilendiaminotetraacético
- **ERN** Especies reactivas de nitrógeno

- **EROS** Especies reactivas del oxígeno
- **FeSO₄** Sulfato ferroso
- **GABA** Ácido γ-aminobutírico
- **GPR35** Receptor 35 acoplado a proteínas G
- **GPx** Glutación peroxidasa
- **H₂O₂** Peróxido de hidrógeno
- **HCl** Ácido clorhídrico
- **HPLC** Cromatografía líquida de alto rendimiento
- **IDO** Indolamina-2,3-dioxigenasa
- **KAT** Kinurenina aminotransferasa
- **KCl** Cloruro de potasio
- **KMO** Kinurenina monooxigenasa/kinurenina hidroxilasa
- **KO KAT II** Knock out para la kinurenina aminotransferasa II
- **KYNA** Ácido kinurénico
- **L-KYN** L-kinurenina
- **MAPK** Proteínas cinasas activadas por mitógeno
- **mg** Miligramos
- **MgSO₄** Sulfato de magnesio
- **Min** Minutos
- **min** Minutos
- **MTT** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazo
- **Na₂CO₃** Carbonato de sodio
- **Na₂HPO₄** Fosfato dibásico de sodio
- **NaCl** Cloruro de sodio
- **NAD⁺** Nicotinamida adenin dinucleótido

- **NADPH** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- **NaH₂PO₄** Fosfato monobásico de sodio
- **NaOH** Hidróxido de sodio
- **NCAM** Moléculas de adhesión de células neuronales
- **nm** Nanómetros
- **NMDA** Ácido N-metil-D-aspartico
- **O₂^{•-}** Anión superóxido
- **ONOO⁻** Peroxinitrito
- **OPA** O-ftaldehido
- **Pb** Plomo
- **PL** Peroxidación de lípidos
- **ppm** Partes por millón
- **QUIN** Ácido quinolínico
- **rpm** Revoluciones por segundo
- **S.E.M.** Error estándar de la media
- **Seg** Segundos
- **SNC** Sistema Nervioso Central
- **SOD** Superóxido dismutasa
- **TBA** Ácido tiobarbitúrico
- **TBA-RS** Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
- **TCA** Ácido tricloroacético
- **TDO** Triptófano dioxigenasa
- **TRP** Triptófano
- **VK** Vía de las kinureninas
- **vs.** Versus (contra)
- **WT** Wild-type

RESUMEN

Introducción. El plomo es un metal pesado que ha sido ampliamente utilizado en procesos industriales y que debido a esto su disponibilidad en el ambiente ha provocado que los seres vivos, específicamente los humanos se encuentren en constante contacto con él. Este metal es capaz de ingresar a organismos vivos y causar un desbalance de iones como el calcio, así como la alteración del estado redox celular, teniendo consecuencias en vías de señalización importantes. Además, la presencia del plomo causa alteraciones en parámetros cognitivos en humanos y modelos animales desde concentraciones muy bajas. Una de las vías que también ha sido relacionado con deterioro cognitivo es la vía de las kinureninas (la principal vía de degradación del triptófano), debido a que se producen metabolitos con propiedades neuroactivas como el ácido kinurénico. **Objetivo.** Evaluar el efecto de la intoxicación con plomo durante la lactancia sobre la producción de los metabolitos de la vía de las kinureninas y la posible correlación con el deterioro cognitivo inducido por este metal pesado. **Métodos.** Se realizó una intoxicación de 500 ppm de acetato de plomo (AcPb) a ratones de la cepa FVB del día 0 al día 23 postnatal. Se evaluaron parámetros cognitivos; así como la evaluación de redox en regiones cerebrales ratones intoxicados. Por medio de cromatografía líquida de alta resolución se cuantificaron los niveles de los metabolitos del catabolismo y la actividad de las enzimas de la vía de la kinurenina. **Resultados.** Los ratones intoxicados presentaron hipoactividad acompañada de incremento en parámetros redox como la producción de especies reactivas del oxígeno (EROS, 40%), peroxidación lipídica (PL, 100%), y una disminución de la funcionalidad celular (50%) con respecto al grupo control. Al evaluar el catabolismo del triptófano, se encontró una disminución en las concentraciones de triptófano (50-75% vs. control) y un incremento de los niveles de L-kinurenina (L-KYN, 20-50% vs. control), ácido kinurénico (KYNA, hasta 400% vs control) y 3-hidroxicinurenina (3-HK, 100% vs. control). La actividad de la kinurenina monooxigenasa (KMO, enzima encargada de la síntesis de 3HK) aumentó 500% vs. control, mientras que la actividad de la kinurenina aminotransferasa (KAT II) no mostró cambios con respecto al control. Para evidenciar el mecanismo por el cual se encontraron altos niveles de KYNA sin que la actividad de la enzima responsable de su producción mostrara cambios, se utilizaron ratones knock-out para la kinurenina aminotransferasa II (KO KAT II). Los ratones KO KAT II fueron intoxicados con el mismo esquema. Se observó que los ratones KO KAT II intoxicados presentaron hipoactividad. Además, se encontró un incremento de EROS (30-60%), PL (50-100%) y disminución de la funcionalidad celular (35-50%) en tejido cerebral con respecto a su control. En cuanto al

catabolismo del triptófano se encontró un incremento en los niveles de L-KYN (30-50%), 3-HK (30-200%) y de KYNA (200-700%). Sugiriendo que el aumento en los niveles de KYNA inducidos por plomo son producidos por una vía no canónica, probablemente relacionada con el estado redox celular. Para determinar el impacto en la memoria y aprendizaje por la intoxicación con plomo durante la lactancia, otro grupo de ratones fue intoxicado en el periodo de lactancia, dicha intoxicación fue retirada al día 23 postnatal y se cambió por agua potable. A los 60 días postnatales se realizaron las pruebas motoras y de memoria y aprendizaje. Los ratones intoxicados con plomo durante el periodo de lactancia no mostraron cambios en la actividad locomotora. La memoria y aprendizaje se evaluó por la prueba de alimento enterrado y se observó que los ratones intoxicados con plomo no presentaron cambios en el aprendizaje con respecto al grupo control, sin embargo, presentaron alteraciones en la memoria, ya que se observó que los ratones intoxicados tardan más tiempo y recorren más del doble de la distancia para llegar al lugar de interés en dicha prueba. En cuanto a los cambios bioquímicos encontrados en cerebro destaca la disminución del 50% en la funcionalidad celular en los animales intoxicados a los 60 días de edad. Los niveles de KYNA se encontraron elevados al doble (sin cambio alguno en la actividad de la KAT) y los niveles de 3-HK disminuyeron significativamente, acompañado de una menor actividad de la KMO. **Conclusiones.** Con estos resultados se demuestra que el plomo es capaz de alterar la producción de los metabolitos de la vía de las kinureninas principalmente de KYNA, lo cual está relacionado con las alteraciones cognitivas inducidas por la intoxicación con este metal durante el periodo de lactancia.

ABSTRACT

Introduction. Lead is a heavy metal that has been widely used in industrial processes and due to this, its availability in the environment has caused that specifically, humans are in constant contact with it. This metal can enter living organisms and causing an imbalance of ions such as calcium, as well as the alteration of the cellular redox environment, which has consequences in essential signalling pathways. Furthermore, the lead causes alterations in cognitive parameters in humans and animal models from very low concentrations. One of the pathways that have also been related to cognitive impairment is the kynurenine pathway (KP, the main degradation pathway for tryptophan), due to the production of metabolites with neuroactive properties such as kynurenic acid. **Objective.** Evaluate the effect of lead poisoning during the lactation period on the production of kynurenine pathway metabolites and its possible correlation with the cognitive impairment induced by this heavy metal. **Methods.** FVB strain mice were intoxicated with 500 ppm of lead acetate (AcPb) from 0 to 23 postnatal days. Cognitive parameters were evaluated, and redox determinations were made in brain regions in intoxicated mice, metabolites levels and the KP enzymes activity were quantified using high-performance liquid chromatography. **Results.** Intoxicated mice showed hypoactivity and an increase in redox parameters, such as the production of reactive oxygen species (EROS, 40%), lipid peroxidation (PL, 100%), and a decrease in cellular functionality (50%) concerning the control group. In the evaluation of the tryptophan catabolism, a reduction in tryptophan concentrations (50-75% vs. control) and an increase in L-kynurenine levels (L-KYN, 20-50% vs. control), kynurenic acid (KYNA, up to 400% vs. control), and 3-hydroxykynurenine (3-HK, 100% vs. control) was found. Kynurenine monooxygenase activity (KMO, the enzyme responsible for the 3HK synthesis) increased 500% vs. control, while the kynurenine aminotransferase activity (KAT II) did not show change compared to control. Knock-out mice for kynurenine aminotransferase II (KO KAT II) were used to explain the increase in KYNA levels without a change in KAT activity. KO KAT II mice were intoxicated and evaluated under the same scheme, showing to be hypoactive. Besides, an increase in EROS (30-60%), PL (50-100%), and a decrease in cellular functionality (35-50%) were found in brain tissue to its control. Regarding the tryptophan catabolism, an increase in the L-KYN levels (30-50%), 3-HK (30-200%), and KYNA (200-700%) was observed, suggesting that the increase in lead-induced KYNA levels is produced by a non-canonical pathway, probably related to the cellular redox environment. Another group of mice was intoxicated to determine the impact on memory and learning due to lead poisoning during lactation. The lead was removed on 23 postnatal days and changed

to drinking water. At 60 postnatal days, motor and memory and learning tests were performed. Mice exposed to lead during the lactation period showed no changes in locomotor activity. Memory and learning were evaluated by the buried food test, observing that intoxicated mice did not present changes in learning compared with the control group, however, they presented alterations in memory, since mice took longer and travelled more distance to reach the place of interest of that test. Regarding the biochemical changes in the brain, a decrease of 50% in cellular functionality in intoxicated animals at 60 days of age was found. KYNA levels were doubled (without any change in KAT activity), and 3-HK levels decreased significantly, accompanied by lower KMO activity. **Conclusions.** These results show that lead can alter the production of kynurenine pathway metabolites, mainly KYNA, which is related to the cognitive alterations induced by intoxication with this metal during the lactation period.

INTRODUCCIÓN

Plomo

La invasión humana ha sido uno de los factores importantes para el daño de ecosistemas ya que, la disponibilidad de una amplia variedad de contaminantes químicos en el medio ambiente ha ido en constante aumento por la actividad industrial. Entre los contaminantes ambientales más importante se encuentran los metales pesados, teniendo efectos adversos debido a su incapacidad de degradarse biológica o químicamente en la naturaleza. Los efectos negativos de estos metales pesados se dan principalmente por la capacidad de acumularse en los organismos vivos.

El plomo (Pb) es un metal pesado muy dúctil y maleable el cual tiene un número atómico de 82 y un peso molecular de 207.2 g/mol. El Pb se encuentra como componente del suelo y de manera histórica se ha encontrado presente en el ambiente por su amplio uso como materia prima de diversos procesos tecnológicos, debido a sus características tales como: ductilidad, alta densidad, poca reactividad química, fácil extracción, abundancia y relativo bajo costo. Este metal fue usado como componente de pinturas durante los años 60's y más recientemente se ha utilizado como recubrimiento de pipas que transportan agua, como aditivo en gasolinas (retirado de ella en los años 90's), como componentes de baterías, recubrimiento de cables, material para soldar, cosméticos, juguetes, cigarros, armas, pigmentos, cerámica, etc. (Garza et al., 2005; Wani et al., 2015). Como resultado de su naturaleza no biodegradable y su amplia utilización, la persistencia prolongada del Pb en suelos (minas abandonadas y basureros tecnológicos), agua (ríos y lagos cercanos a fábricas y minas y agua doméstica) y aire es muy frecuente (Harding et al., 1998; Mager, 2012; Laniyan y Adewumi, 2020).

A pesar de que el Pb no es un metal endógeno, se ha encontrado acumulado en organismos vivos. Debido a su alta biodisponibilidad, las fuentes de exposición a este metal son diversas. El ingreso de este metal a organismos vivos se da primero por ingestión e inhalación para secundariamente, ser absorbido a través del estómago e intestinos, el ingreso a torrente sanguíneo y así, se dé la distribución sistémica de este metal. La inhalación se da por medio de la mucosa nasal y pulmones. Sin embargo, la absorción del Pb puede constituir el mayor riesgo para la salud pública ya que, en poblaciones humanas, es la principal entrada a tejidos de órganos blandos por medio de la sangre. Los niños son particularmente sensibles a los efectos de este metal ya que por su naturaleza de

exploración y el proceso de desarrollo son más susceptibles a la ingestión de este metal, esto es de suma importancia, ya que se ha observado que la etapa más vulnerable a los efectos del Pb es la infancia (Braun et al., 2012). El Pb es capaz de acumularse en órganos blandos como pulmones, hígado, riñones, bazo y en sistema nervioso central (SNC), además de encontrarse en hueso; este metal es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y placentaria (Glass et al., 2009). La vida media del plomo se ha considerado más larga en niños que en adultos; en torrente sanguíneo se puede encontrar presente hasta 35 días (10 meses en niños), en tejido blando 40 días, en hueso trabecular 90 días y hasta 30 años en hueso cortical después de la exposición (Papanikolau et. al, 2005; Soacha, 2009; Goyer y Mahaffey, 1972; Ponds et al., 1991; Toscano y Guilarte; 2005).

Una vez dentro de un organismo vivo, el Pb es capaz de entrar a las células fácilmente, ya que utiliza sistemas de transporte de iones esenciales como calcio, zinc y magnesio. Uno de los transportadores utilizados por este metal es el transportador de moléculas divalentes catiónicas 1 (DCT1) ó también llamado DMT1 (Ballatori, 2002); además, ha sido reportado que el plomo puede inhibir a los receptores para ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), canales de potasio activados por voltaje, receptores colinérgicos y canales de calcio activados por voltaje; este metal tiene gran afinidad por estos últimos, haciendo que el transportador se bloquee por la acumulación de moléculas de plomo a través de él (Garza et al., 2005). Por otra parte, este metal pesado es capaz de unirse a proteínas importantes como la calmodulina, la cual actúa en las terminales sinápticas como un sensor de las concentraciones de calcio libre y como un mediador de la liberación de neurotransmisores como acetilcolina, dopamina, noradrenalina y ácido γ -aminobutírico (GABA) (Sharma et al., 2014). Además, interfiere con los receptores acoplados a segundos mensajeros como la proteína C provocando un cambio en expresión de genes y síntesis de proteínas (NourEddine D. et al., 2005).

El principal mecanismo de toxicidad del plomo se da por la sustitución de iones calcio de algunas proteínas, ya que éstas cambian su estructura e incluso su función. Los ejemplos más comunes son las moléculas de adhesión/señalización intercelular como las moléculas de adhesión de células neuronales (NCAM) y las cadherinas con lo cual es capaz de alterar los sistemas de señalización. Además, se ha observado que el plomo tiene un efecto muy grande en organelos como la mitocondria dado que se acumula dentro de ella, reduciendo el metabolismo energético celular y favoreciendo la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs); además de inhibir la entrada de calcio y promover la salida de éste de la

mitocondria y finalmente este desarreglo puede llevar a la apertura del poro mitocondrial que conlleva a la liberación de citocromo C, favoreciendo la apoptosis (He et al., 2000). En el retículo endoplásmico inhibe el funcionamiento de la ATPasa de calcio y provoca la acumulación de proteínas mal plegadas en células. En el núcleo se une a la cromatina y proteínas nucleares (Garza et al., 2005). Por otra parte, el plomo es capaz de alterar el metabolismo de moléculas eritrocitarias por medio de la inactivación de enzimas relacionadas con la síntesis del grupo hemo debido a la competencia y desplazamiento del calcio (Flora S. J. et al., 2008; Garza A. et al., 2005 y Villeda-Hernández et al., 2001).

Adicionalmente, el estrés oxidante inducido por el plomo incluye daño a la membrana celular y ADN, así como a enzimas (catalasa, superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, ya que se ha observado que disminuye la actividad de éstas en presencia de Pb y antioxidantes no-enzimáticos como el glutatión en sistemas animales y humanos (Valko et al., 2005, Flora et al., 2008).

Se ha reportado que animales expuestos a bajos niveles de plomo durante el desarrollo tienen niveles altos de dopamina comparados con el grupo control, potenciando de esta manera la neurotransmisión catecolaminérgica en corteza cerebral, hipocampo y cerebelo (Leret et al., 2002; Devi et al., 2005); mientras que ratas expuestas a altas concentraciones de este metal muestran una disminución en los niveles de dopamina (Devi et al., 2005; Nava et al., 2012). Por otra parte, el receptor NMDA, cuya actividad es mediada por calcio y que se sabe juega un rol central en aprendizaje y memoria, es afectado por la presencia de este metal pesado, ya que, es capaz de interferir con el influjo de calcio hacia el interior de la célula y así resultando en la interacción de este metal con proteínas como la calmodulina, alterando las vías de señalización como la de AMPc (adenosín monofosfato cíclico) (Goyer 1997; Goyer y Clarkson 2001).

Efectos del plomo en la cognición en humanos y modelos animales

Diversos trabajos han reportado que el Pb tiene efectos dependiendo de la concentración de Pb en sangre, así como la edad y el periodo de exposición a este metal; Pb causa deterioro en la audición, del aprendizaje y funciones cognitivas en humanos y modelos experimentales en animales (Lancranjan et al., 1975). En humanos, particularmente en niños, se ha observado que en rangos de concentración de Pb en sangre de entre 1 – 10 µg/dl de sangre existen deficiencias en parámetros de procesamiento verbal, lectura, aritmética, así como una disminución en las puntuaciones de coeficiente intelectual (CI),

memoria a corto plazo y tests de atención (Bellinger et al., 1992, Braun et al., 2008, Jusko et al., 2008). Durante la adolescencia los niveles de plomo en tibia o una previa exposición a este metal se ha asociado a conductas de agresividad, comportamiento delincuente y antisocial (Hu et al., 1998; Dietrich et al., 2001). En la edad adulta los altos niveles de plomo en tibia (18.7 µg/g) se han asociado con una disminución en algunos parámetros cognitivos como el lenguaje, memoria visual y verbal y aprendizaje. Además, una exposición al Pb en etapas tempranas de la vida se ha asociado con enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson, en este último sólo cuando la exposición es combinada con otro metal (Shih et al., 2006; (Basha & Reddy, 2010; Gorell et al., 1999).

En otros estudios, se ha comprobado que este metal pesado produce una disminución en la formación de mielina y que las células endoteliales de la barrera hematoencefálica son capaces de almacenar este metal y acumularlo en diferentes zonas del cerebro, principalmente corteza parietal, hipocampo y cerebelo (Villeda-Hernández et al., 2001); además, se ha visto que el Pb incrementa la permeabilidad en astrocitos por la expresión de la acuaporina 4 (Gunnarson et al., 2005).

Se ha observado que los efectos de este metal en el SNC son más severos durante el desarrollo. Sin embargo, también se ha demostrado que el Pb causa una disminución permanente e irreversible en la capacidad cognitiva en niños (Lockith et al., 1993). En poblaciones que se encuentran en zonas de alta contaminación en el aire se han asociado los niveles de plomo en sangre (desde 1 µg/dL) con la disminución de hasta dos puntos en la escala del coeficiente intelectual; esto acompañado de déficits en cognición en el área verbal, aritmética, atención y memoria de trabajo (Mostafa et al., 2009). Se ha encontrado que la ventana de tiempo en que los niños son más vulnerables es entre los 2 y 4 años, ya que parece ser éste un período crítico para la inteligencia y rendimiento académico, además de encontrar que la cantidad de Pb que puede atravesar la barrera hematoencefálica es 2.05-2.42 veces mayor que en adultos (Hou et al., 2013).

En este contexto, se ha observado que adultos expuestos laboralmente al plomo en el presente o pasado, así como adultos ambientalmente expuestos, muestran una asociación entre exposición al plomo y deterioro de la función cognitiva (Shih et al., 2007). Trabajadores expuestos durante 11 años a plomo mostraron una disminución de la actividad cerebral en redes corticales (Seo et al., 2014). Así como personas con exposición de cerca de 45 años y evaluados durante 9 años observaron pérdida de densidad neuronal, efectos que se

reflejaron en el déficit en memoria de trabajo y ejecutiva, así como en habilidades de lenguaje y verbal (Weisskopf et al., 2004). A nivel del SNC, parece que los niños son más sensibles a este metal, presentan disminución del coeficiente intelectual, retrasos en el desarrollo y problemas de audición; sin embargo, el mecanismo por el cual produce estos efectos tóxicos sobre el desarrollo cognitivo no es aún del todo claro (Lacasaña-Navarro et al., 1999; Sunyer et al., 2015).

En el caso específico de modelos animales se ha observado que al igual que en humanos, el efecto que el Pb causa en ellos depende del periodo, la longitud y la etapa en la que se administre este metal. Se ha observado que cuando el periodo de intoxicación incluye el periodo gestacional y las etapas temprano del desarrollo de los animales, el Pb causa una alteración en la funcionalidad de enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa) así como, el incremento de EROs y de la peroxidación lipídica. Sumado a estos efectos bioquímicos, se ha observado que la intoxicación por plomo en este mismo periodo desencadena una serie de alteraciones conductuales tales como, una disminución en la exploración, locomoción, en el tiempo de movimiento en campo abierto, déficits en la memoria de trabajo y en el aprendizaje (Fan et al., 2019; Gargouri et al., 2012; Babu et al., 2007; Chintapanti et al., 2018; Thangarajan et al., 2018; Xue et al., 2017).

18

Sin embargo, cuando la intoxicación por plomo se da en etapas más tardías de estos animales, como en la etapa adulta, se suman marcadores tales como la alteración en la transmisión sináptica, plasticidad en hipocampo, alteración en los niveles de neurotransmisores como acetilcolina y serotonina; además de la alteración en parámetros de cognición como la memoria, la intoxicación por plomo desencadena ansiedad y agresión (Ebuehi et al., 2012; Phyu y Tangpong, 2012; Phyu y Tangpong, 2014).

Estrés oxidante

En un organismo sano existe un balance de óxido-reducción, pero cuando este desbalance se rompe da paso a el estrés oxidante que se define como el desbalance entre la producción de especies reactivas y la actividad de los sistemas antioxidantes; este desbalance se puede deber al exceso de oxidantes en el medio o el mal funcionamiento del sistema

antioxidante (Shukla et al., 2001), provocando que la célula entre en un estado de toxicidad por especies reactivas de nitrógeno (ERN), ERO y radicales libres.

Las EROs son moléculas que pueden interaccionar con componentes celulares y pueden ser especies radicales, que son aquellas que tienen un átomo desapareado en la órbita externa y se forman por una ruptura homolítica y los no radicales. Los radicales se forman a partir del oxígeno molecular y dará paso a otros radicales como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , no radical) y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Las ERN, como el óxido nítrico pueden reaccionar con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y formar peroxinitrito (ONOO^-) y este a su vez puede dar lugar al ácido peroxinitroso y formar $\cdot\text{OH}$ (Selva-Rivas et al., 2011).

Las EROs participan en vías de señalización ya que median la transducción de señales que regulan la respuesta al estrés oxidante y así son responsables de la expresión de las enzimas antioxidantes y sistemas de defensa relacionados, pero también son moduladores de la respuesta inflamatoria y son responsables de procesos fisiológicos como la regulación de la constricción vascular y la regulación de la presión del oxígeno (Kvietys et al. 2011). Las EROs son capaces de activar la vía de las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógeno) que a su vez activan proteínas con importancia en la modulación de funciones celulares específicas como expresión de receptores, síntesis de neurotransmisores, producción de neuropéptidos, etc. Sin embargo, se sabe que las EROs tienen efectos nocivos en la célula ya que pueden interactuar con componentes celulares como proteínas, lípidos y ADN. El efecto de la oxidación de proteínas se puede dar a nivel de sitios de unión o la conformación estructural de las proteínas; la oxidación de ADN puede provocar mutaciones y tener un efecto directo en la replicación; la oxidación de lípidos, principalmente ácidos grasos insaturados, puede generar peroxidación de lípidos, los cuales a su vez pueden oxidar a los lípidos cercanos y finalmente generar una reacción en cadena cuyos productos de esta reacción son el 4-hidroxinonenal y malonaldehído, los cuales sirven como marcadores de estas reacciones, lo que lleva al daño celular permanente, ya que la estructura membranal pierde su conformación hasta llegar a una destrucción completa de la envoltura celular (Selva-Rivas et al., 2011, Coyle y Outtfarcken, 1993; Andersen, 2004).

La producción de EROs se da de manera natural dentro de la célula a causa de procesos metabólicos como la oxidación de moléculas pequeñas. Las enzimas son una de las principales fuentes de producción de EROs ya que generan radicales libres durante su ciclo

catalítico. La mitocondria es el organelo que consume más del 90 % de oxígeno de la célula y es el mayor productor de radicales debido al metabolismo del oxígeno que consume. Estructuras celulares como el retículo endoplásmico y la membrana nuclear contienen citocromos (P450 y b5) que son capaces de oxidar a ácidos grasos insaturados. Otra de las fuentes productoras de EROs son los peroxisomas ya que por su alta concentración de oxidasas son fuente de producción de H_2O_2 (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza Chaverri, 2006; Eliška Holzerová y Holger Prokisch, 2015; Sandalio et al., 2013). Aunado a esto, se sabe que también las EROs pueden ser producidas por agentes externos como son las fuentes ambientales como el ozono, pesticidas, hiperoxia, el humo de tabaco, solventes, anestésicos, hidrocarburos aromáticos, metales, etc. (Selva-Rivas et al., 2011).

El estrés oxidante es un proceso natural en el que se presenta durante el envejecimiento y toma un papel importante en el desarrollo en las enfermedades degenerativas como la diabetes o el cáncer pero también en desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer, Parkinson o Huntington; sin embargo, aún no se tiene claro si el estrés oxidante es una causa o una consecuencia de cada una de ellas, pero todas ellas tienen en común factores como: la disfunción mitocondrial, estrés oxidante, presencia de agregados anormales de proteínas, excitotoxicidad y alteración del metabolismo del hierro (Shukla et al., 2011).

20

Uno de los órganos más vulnerables al daño oxidante es el SNC debido a que está compuesto por una alta cantidad de lípidos, por la demanda de oxígeno que requiere para su alta actividad y además por los bajos niveles de expresión y actividad de sistemas antioxidantes. Es claro que para el buen funcionamiento del SNC es necesario que las conexiones entre células neuronales sean correctas; el estrés oxidante es capaz de alterar estas conexiones produciendo daño oxidante, pérdida de procesos (como la comunicación neuronal), la muerte de las sinapsis y la alteración de formación de nuevas células. Las especies reactivas producen oxidación de lípidos, proteínas y ADN, desacoplamiento de proteínas e incluso cambio en la membrana celular produciendo un desbalance neuronal. Smythies (1999) propone que es muy importante un estado redox balanceado en la plasticidad cerebral en el cual un ambiente oxidante provoca un estado de estrés, en donde las EROs causan la eliminación de espinas celulares; pero que en un ambiente antioxidante es posible que las sinapsis se conserven e incluso su número aumente (Shukla, et al., 2011). Las especies reactivas forman parte de importantes vías de señalización, como reguladoras o como producto de ellas, una de las vías que puede ser regulada por la presencia de EROs es la vía de las kinureninas.

Vía de las kinureninas

El triptófano (TRP) es un aminoácido esencial e indispensable, utilizado para la síntesis de niacina, serotonina y proteínas. La degradación de este aminoácido (aa.) contiene varias rutas, entre ellas: la formación de compuestos no aromáticos del triptófano, (1-2% por la vía del glutarato), en la vía de la serotonina (1-2%), en la biosíntesis de melatonina, en la formación de 3-indoxisulfato (3% por acción de una bacteria intestinal), en la formación de ácido 3-indoleacético (3-4%). Sin embargo, la mayor ruta metabólica a través de la cual se degrada más del 90% del TRP es la vía de las kinureninas (VK) (Allegri et al., 2003). La VK es la ruta principal de la degradación de este aa. en mamíferos (Pearson y Reynolds, 1992), cuyo producto final es la formación de nicotinamida adenin dinucleótido (NAD^+), una coenzima involucrada en procesos celulares básicos, funcionando como un donador y aceptor de electrones. Esta vía es muy activa, aunque la actividad de cada una de las enzimas involucradas difiere entre especies. La VK se ha encontrado presente en cerebro e hígado en mamíferos como cerdos, ratas, ratones, conejos y primates (Moroni et al., 1984). El desbalance en la producción de los metabolitos de la VK se ha asociado con diversos desórdenes neurodegenerativos, ya que muchos de ellos tienen propiedades neuroactivas y redox (Lapin 1980; Stone 1993; Lugo Huitrón et al., 2011).

21

El TRP es degradado por diferentes enzimas a través de varios pasos enzimáticos. En el primer paso enzimático, en el hígado y otros tejidos de la periferia, el anillo indólico del L-triptófano es cortado oxidativamente por la enzima triptófano dioxigenasa (TDO), produciendo así N-formil kinurenina. En el SNC, la enzima responsable de esta reacción es la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), la cual es dependiente de radical superóxido (Hirata y Hayaishi, 1971; Thomas et al., 1994). El siguiente paso en la vía es la conversión de N-formil kinurenina a L-kinurenina (L-KYN) por la formamidasa. La L-KYN a su vez sirve como sustrato para 3 distintas enzimas: la kinureninasa (convirtiéndola a ácido antranílico), la kinurenina 3-hidroxilasa o kinurenina 3-monooxigenasa (KMO, convirtiéndola a 3-hidroxikinurenina (3-HK)), y las kinurenina aminotransferasas (KATs), quienes catalizan la transaminación irreversible de L-KYN a ácido kinurénico (KYNA) (Schwarcz y Stone, 2016; González et al., 2017;). En humanos, la formación de KYNA involucra tres isoformas de KAT (KAT I, II y III). Estas enzimas difieren en su pH óptimo y se ha sugerido que la KAT II, la cual tiene un pH óptimo en el rango fisiológico, puede ser la principal responsable de la síntesis de KYNA en el cerebro humano (Gramsbergen et al., 1997). Posteriormente, la vía lleva a la formación de ácido quinolínico (QUIN) a través de la hidroxilación de la L-KYN a

3-HK. Esta reacción es llevada a cabo por la KMO (Okamoto et al., 1967) y requiere de la presencia de NADPH como donador de un electrón. La kinureninasa, una enzima dependiente de piridoxal fosfato convierte a la 3-HK a ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA). La enzima ácido 3-hidroxiantranílico dioxigenasa (3-HAO) inicia abriendo el anillo de 3-HA, convirtiéndolo en 2-amino-3-carboximuconato semialdehído, un intermediario inestable, el cual es instantáneamente convertido a QUIN. Finalmente, el QUIN es metabolizado a NAD⁺ por la enzima ácido quinolínico fosforibosil transferasa, la cual está localizada en astrocitos (Stone, 1993).

En el cerebro, todas las enzimas de la VK son primariamente expresadas en astrocitos, microglia y macrófagos infiltrados (Okuno et al., 1991; Du et al., 1992; Heyes et al., 1996; Guillemin et al., 2001). Los metabolitos de la VK poseen propiedades redox, mientras que las enzimas de la vía son moduladas por el microambiente (radicales libres, antioxidantes y citocinas pro-inflamatorias). La alteración en los niveles de los metabolitos de la VK en diversas patologías, sugieren un estado celular complicado en el cual las células son más vulnerables al daño y además están estrechamente relacionados con las alteraciones cognitivas, inflamación, estrés oxidante y el declive de la respuesta inmune, eventos que están presentes en el envejecimiento y enfermedades relacionadas con este proceso. Las alteraciones en la VK han sido involucradas en el envejecimiento y diversos desórdenes, tales como la enfermedad de Huntington, Alzheimer, el complejo demencia-SIDA, Parkinson, esquizofrenia, entre otros (Stone, 2001; Stone & Darlington, 2002).

Kinurenina aminotransferasa (KAT)

La enzima responsable de la formación del ácido kinurénico es la kinurenina aminotransferasa (KAT). De las KATs se han encontrado cuatro isoformas I-IV, estas enzimas son dependientes de piridoxal ya que tiene dos lugares de unión para piridoxal-5-fosfato. La KAT I prefiere como co-sustratos el piruvato y el piridoxal-5-fosfato y es fuertemente inhibida por los sustratos como TRP, fenilalanina y glutamina; se ha encontrado localizada principalmente en astrocitos (Akladios et al., 2012). La KAT II podría ser moderada por el estado redox ya que sustratos como el oxoglutarato, piruvato y ácido oxolacético (compuestos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos) estimulan su actividad y es inhibida por α -aminoadipato, cisteína sulfinato, ácido (R)-2-amino-4-(4-etilsulfonil)-4-oxobutanoico y PF- 04859989 (Wong et al., 2011; Reyes et al., 2014). KAT III utiliza como

sustratos la glutamina y el ácido α -ceto- γ -metilbutirato mientras que la metionina, histidina, glutamina, leucina, citeína y 3-HK disminuyen la actividad de esta isoforma (Pinto et al., 2014).

La isoforma IV se ha reportado estar en mitocondria utilizando α -cetoglutarato, fenilpiruvato, indo-3-piruvato, hidroxifenilpiruvato, mercaptopiruvato, ácido α -cetocaproico, oxalacetato, α -cetobutirato, piruvato y glioxilato. Esta isoforma ha mostrado que forma parte de la producción de KYNA en cerebro de ratón. Los inhibidores de esta isoforma enzimática son el aspartato, glutamato, glutamina, fenilalanina, tirosina, cisteína, triptófano e histidina (Guidetti et al., 2007; Han et al., 2010; Qian et al., 2011).

Estas enzimas son sensibles al pH, en especial la KAT I la cual tiene un pH óptimo de 10, mientras la isoforma II tiene un pH óptimo de 7.4, KAT III funciona de manera óptima a un pH de 9 y la isoforma IV a un pH de 8; es por lo que la isoforma II de la KAT es aquella a la que se le atribuye la principal producción de ácido kinurénico (Wong et al., 2011; Schmidt et al., 1993).

Ácido kinurénico (KYNA)

El KYNA es un metabolito de la VK el cual es sintetizado por la transaminación irreversible de su precursor L-KYN por medio de las KATs. KYNA es un antagonista no-competitivo para los receptores NMDA (Erhardt et al., 2004) y es antagonista de amplio espectro para receptores de aminoácidos excitadores (Perkins y Stone, 1982), además de ser capaz de interactuar como un antagonista competitivo de los receptores AMPA y kainato (Bertolino et al., 1989). Por otra parte, KYNA se ha caracterizado como un bloqueador no competitivo del receptor $\alpha 7$ nicotínico, aunque esto está muy controvertido actualmente (Hilmas et al., 2001; Stone, 2020). KYNA puede ejercer neuroprotección a través de la modulación del receptor 35 acoplado a proteínas G (GPR35); ya que al ser ligando de este receptor inhibe las señales pro-inflamatorias (Wang et al., 2006). Otro de los blancos de KYNA es el receptor aril hidrocarbonado, el cual es un receptor a agentes tóxicos externos (xenobiótico), al unirse KYNA es capaz de activarlo; la activación de este receptor se ha asociado con la supresión de la respuesta inmune celular favoreciendo el crecimiento tumoral por la vía de la Interleucina 6 (DiNatale et al., 2010). Recientemente KYNA se caracterizó como un antioxidante, ya que en sistemas sintéticos de producción de radicales libres es capaz de atrapar anión superóxido, hidroxilo y peroxinitrito y es capaz de proteger del daño evocado tanto *in vitro* como *in vivo* de FeSO_4 (Lugo-Huitrón et al., 2011).

KYNA tiene gran importancia a nivel de SNC y se le ha propuesto como neuromodulador (Zmarowski et al., 2009; Wu et al., 2010) ya que las fluctuaciones en sus niveles de éste metabolito en el cerebro está asociada con dramáticos efectos en la actividad neuronal dopaminérgica. Se ha observado que KYNA afecta la liberación de glutamato, norepinefrina y dopamina y viceversa. Además, se ha observado que el aumento en las concentraciones de KYNA conlleva a una disminución en los niveles de dopamina, y este efecto es atribuido a su acción como antagonista sobre receptores nicotínicos (Wu et al., 2007).

Sin embargo, un excesivo bloqueo de los receptores nicotínicos y NMDA por un aumento en los niveles de KYNA se ha vinculado con el deterioro cognitivo. En este contexto, la elevación aguda de KYNA en ratas adultas lleva a alteraciones en el trabajo de memoria, aprendizaje y flexibilidad cognitiva. El área cerebral implicada principalmente en esas alteraciones es el hipocampo, que es rico en receptores para NMDA y nicotínicos (Ben-Ari et al., 1997; Dwyer et al., 2009; Timofeeva and Levin, 2011). Estudios experimentales muestran que una disminución en los niveles de KYNA en el hipocampo constituyen una estrategia efectiva para el declive cognitivo (Pocivavsek et al., 2011).

Ratones knock-out para KAT-II

Dada la importancia del ácido kinurénico, se desarrolló como herramienta un ratón knock-out para la KAT II (KO KAT II), la enzima que es responsable de la transaminación de L-KYN a KYNA. La destrucción del gen de KAT II en ratones por recombinación homóloga, indujo una reducción perinatal de KYNA en el cerebro de los ratones durante el primer mes de edad; sin embargo, dichos niveles retornaron los valores normales más tarde. En contraste, la actividad de las KATs y los niveles de KYNA en hígado disminuyeron más del 90% durante toda su vida. La reducción en los niveles de KYNA cerebrales se acompañó por anormalidades conductuales ya que los ratones llegaron a manifestar hiperactividad y coordinación motora anormal a las 2 semanas de edad, pero ésta se hizo indistinguible de la actividad de los ratones silvestres a los 30 días postnatales. Por otra parte, no se observaron efectos en la viabilidad, longevidad y fertilidad en los ratones KO KAT II. Cabe resaltar que, dado que los cambios bioquímicos y conductuales en estos ratones KO KAT II fueron transitorios, y mejoraron a las 4 semanas de edad con la completa restauración de los niveles de KYNA cerebrales, fue entonces que propusieron mecanismos complementarios que pudieran estar relacionados con las diferentes isoformas de las KATs

(Yu et al., 2004). Sin embargo, los niveles de ARNm de KAT I en los ratones KO KAT II no fueron significativamente mayores al de los silvestres.

JUSTIFICACIÓN

Con base a estos antecedentes podemos decir que muchos factores están involucrados con la vulnerabilidad celular a la presencia de metales como el plomo. Dentro de estos factores se encuentran el ambiente redox, la excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial, y todos ellos pueden converger y llevar a la degeneración y muerte celular. Sin embargo, es importante considerar los metabolitos endógenos que pueden estar influenciando ya sea de manera positiva o negativa la toxicidad inducida por este metal. En este contexto, los metabolitos del catabolismo del TRP que poseen propiedades redox y neuroactivas, podrían representar un mecanismo adicional por el cual el plomo ejerce sus efectos neurotóxicos. Hasta el momento no hay un solo estudio que esté enfocado en investigar si la intoxicación por algún metal lleva a alteraciones en los metabolitos de la vía de kinurenina, sin embargo, no es difícil pensar que esto puede estar ocurriendo ya que dentro de los efectos tóxicos de estos metales se ha reportado daño oxidante e inflamación, eventos que como describimos anteriormente están relacionados con la modulación de la VK.

HIPÓTESIS

Si la intoxicación con plomo modifica el ambiente redox entonces el catabolismo del triptófano se encontrará afectado y los metabolitos neuroactivos de su degradación estarán correlacionados con el deterioro cognitivo inducido por este metal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la intoxicación por plomo durante el período de lactancia en la generación de los diferentes metabolitos de la vía de la kinurenina y su relación con el deterioro cognitivo en ratones.

Objetivos particulares

- Evaluar la actividad motora en ratones de 23 DPN intoxicados con plomo durante el período de lactancia.
- Determinar la cantidad de plomo en tejido de ratones intoxicados con plomo durante el período de lactancia.
- Determinación de marcadores de daño celular y estado redox en ratones intoxicados con plomo durante el período de lactancia.
- Determinación por HPLC de los metabolitos de la vía de la kinurenina en tejido de ratones intoxicados con plomo durante la lactancia.
- Determinación de la actividad de enzimas de la VK (IDO, KAT II y KMO) en tejidos de ratones intoxicados con plomo durante la lactancia.
- Evaluar la actividad motora, así como parámetros cognitivos como la memoria y aprendizaje en ratones de 60 DPN intoxicados durante el período de lactancia.
- Determinar los marcadores de daño celular y estado redox celular en ratones de 60 DPN intoxicados con plomo durante el período de lactancia.
- Cuantificar los niveles de los metabolitos, así como la actividad de las enzimas de la VK en ratones de 60 DPN intoxicados con plomo durante el período de lactancia.
- Correlacionar los efectos de la intoxicación con plomo durante la lactancia sobre los parámetros cognitivos y los niveles de los metabolitos de la VK en ratones de 60 DPN.
- Evaluar los niveles de KYNA y la actividad de KAT en ratones KO KAT II intoxicados durante el período de lactancia.

MÉTODOS

Animales

Se usaron ratones knock-out para la kinurenina aminotransferasa II (KO KAT II) y ratones wild type cepa FVB (WT), obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (Ciudad de México). Antes de ser usados para los experimentos, se alojaron 8 animales por caja, en cajas de acrílico y en condiciones constantes de dieta de roedor comercial estándar y agua *ad libitum*. Se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$) y de iluminación (ciclos de 12 h de luz/oscuridad). Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud y de las normas locales sobre el uso ético de los animales de la Secretaría de Salud de México. Durante las disecciones, se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales sacrificando a estos por medio de decapitación.

29

Formación de grupos

Se utilizaron ratones de la cepa FBV a los cuales se les intoxicó con plomo (AcPb) formando grupos con una $n=8$ animales. Los animales estuvieron expuestos al AcPb a través del agua de bebida por un período de 23 días (0-23 días posnatal (DPN) a una concentración de 500 ppm. A los grupos control se les dio agua potable. (Gaspar et al., 2014, Sharifi et al., 2010). Se realizó la medición de la cantidad de agua consumida para cada uno de los grupos por día con la ayuda del pesaje de los bebederos. Paralelamente se formaron los grupos de ratones KO KATII. Adicionalmente, se formó un grupo con ratones WT, el cual fue intoxicado durante 23 días (0-23 DPN) con 500 ppm de AcPb y después de ese período la intoxicación se interrumpió y el agua se sustituyó por agua potable hasta los 60 días de edad.

Determinación de niveles de plomo en regiones cerebrales

Los niveles de plomo en las regiones cerebrales (hipocampo, estriado, corteza y cerebelo) fueron analizadas por espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito. Las

regiones cerebrales fueron pesadas y digeridas en ácido nítrico suprapuro en un baño de agitación a 60° C por 30 min. Se tomó una alícuota de 100 µl. Se inyectaron las muestras diluidas en un espectrofotómetro de absorción atómica (Modelo 3110; Perkin-Elmer, Norwalk, CT, EE. UU.) con horno de grafito (HGA-600) y auto muestreador (AJS60) ajustado a una longitud de onda de 283.3 nm, utilizando estándares de referencia. Los resultados se expresaron como µg de plomo por mg de tejido (Rojas-Castañeda J., et al., 2011).

Pruebas de actividad motora

Una vez transcurrido el tiempo de exposición (0-23 DPN) se hicieron las pruebas para evaluar la actividad motora en campo abierto a los 23 y 60 DPN. Los ratones se colocaron en un equipo Opto-Varimex 4 en donde se hizo una habituación inicial de 5 minutos y entre cada uno de los animales la caja se limpió con alcohol 10 %. Posteriormente, se volvieron a colocar cada uno de los ratones en el centro de la caja de acrílico en donde por medio de sensores horizontales en los dos ejes, X y Y y sensores para movimientos verticales, se realizaron mediciones sobre el tiempo de descanso y el tiempo ambulatorio, así como de los movimientos horizontales y ambulatorios. La evaluación de la actividad motora en el grupo de 60 DPN se realizó para determinar el efecto a largo plazo de la intoxicación por plomo durante la lactancia.

30

Prueba de alimento enterrado

La prueba de alimento enterrado (BFLT) es una adaptación del modelo descrito por Lehmkuhl y Fleming para la evaluación de la disfunción olfatoria y orientación espacial (Lehmkuhl y Fleming, 2014). Para la habituación de los ratones al alimento se les proporcionaron “froot loops” siete días anteriores a la prueba en su propia caja, una vez al día, verificando que los consumieran al momento. Asimismo, los ratones fueron habituados a la caja tres días antes de la prueba: se colocó al ratón dentro de ésta partiendo de la esquina del cuadrante opuesto (respecto al objetivo) y se dejó explorar durante un tiempo de 10 min.

La versión de la prueba comprende dos sesiones: la sesión de entrenamiento (adquisición) consiste en 6 ensayos (2 minutos de intervalo entre cada ensayo), en el cual los ratones fueron colocados separadamente en una caja de acrílico (1m x 1m) cubierta con una capa

de aserrín de 2 cm y un alimento altamente comestible (donitas azucaradas, “froot loops” (pellet), al cual fueron previamente familiarizados) se enterró aproximadamente 1 cm bajo el aserrín en un cuadrante fijo de la caja (cuadrante objetivo). También se incluyó un ensayo cero donde se coloca el alimento en la superficie para que el animal lo localice por primera vez.

La localización del pellet fue la misma en todos los ensayos y se colocaron pistas visuales en la caja. Si el ratón no encontraba el pellet en el primer ensayo de 180 seg, los ratones fueron gentilmente guiados a él (el pellet fue puesto en la superficie). Se permitió roer el pellet durante 5 seg. Durante esta sesión, los animales estuvieron en ayuno 24 h con libre acceso al agua. Después de cada ensayo, los ratones fueron regresados a su caja y la caja de prueba fue limpiada con una solución de etanol al 10% y el aserrín fue removido para eliminar marcas de olor. Veinticuatro horas después de la adquisición, la memoria a largo plazo fue evaluada en una prueba de retención de 3 min donde el alimento (pellet) fue removido del aserrín y se permitió al ratón explorar la caja por 180 seg; el tiempo en el cual el ratón llegó al lugar preciso del alimento enterrado (el mismo lugar que en la adquisición) fue medido y la distancia recorrida del lugar de inicio al lugar objetivo fue cuantificada. Todas las sesiones fueron video grabadas para el posterior análisis.

Tratamiento de tejidos

Los animales de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron 4 regiones cerebrales (hipocampo, estriado, corteza y cerebelo). Para los experimentos de EROs, PL y funcionalidad celular, los tejidos se homogenizaron en 500 µl de Buffer Krebs pH 7.4 (conteniendo 19 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM glucosa, 13 mM NaH₂PO₄ y 3 mM Na₂HPO₄). Para la determinación de los metabolitos de la VK, se pesaron cada una de las regiones en donde se homogenizaron en 9 volúmenes de agua respecto a su peso y se les agregó 30 µl de ácido perclórico al 6%. Los homogenados se centrifugaron a 14600 g durante 10 min y se obtuvo el sobrenadante para las determinaciones cuantitativas.

Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

La determinación de EROs se estimó por medio de la detección de la fluorescencia de DCF (Ali et al., 1992; Herrera-Mundo y Sitges, 2010). Se incubaron 250 µl de cada uno de los

tejidos y se les adicionó DCF-DA (75 μ M) y se incubaron a 37°C durante 10 minutos en la oscuridad. Al final, las muestras se centrifugaron a 6000 g durante 10 min; la detección de EROs se realizó por medio de espectrofotometría de fluorescencia en un lector de placas Flx-800 Biotek a 448 nm longitud de excitación y 532 nm de longitud de emisión. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína.

Determinación de peroxidación de lípidos (PL)

La peroxidación de lípidos (PL) se evaluó por medio de la producción de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Se colocaron 125 μ L de tejido con 250 μ L de TBA (conteniendo 0.75 g de ácido tiobarbitúrico + 15 g de TCA +2.54 mL de HCl). Esta combinación fue puesta en un baño a ebullición durante 15 minutos, al término se colocaron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron las muestras a 9800 g durante 5 min, se obtuvo la densidad óptica del sobrenadante en un lector de placas Eon (Biotek) a una longitud de onda de 532 nm. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína.

Estimación de la funcionalidad celular (MTT)

La evaluación de la funcionalidad celular se realizó por medio de la reducción de MTT, a 100 μ L de los homogenados de los diversos grupos experimentales se les adicionó MTT (5 mg/mL) y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y se le agregaron 250 μ L de isopropanol ácido al botón para resuspender. Se obtuvo la densidad óptica del sobrenadante en un lector de placas Eon (Biotek) a la longitud óptica de 570 nm. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína. Los resultados se expresaron como porcentaje, tomando el control como el 100% (Reyes-Ocampo et al., 2015).

Cuantificación de proteína por Lowry

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método de Lowry en donde se tomaron 10 μ L del homogenado y se llevó a un volumen final de 200 μ L con agua. Se le agregó 1 mL de solución C (Solución A: Na₂CO₃ 2%, NaOH 0.4% y tartrato de sodio 0.2% + solución B: Cu(SO₄)₃ 0.5% en agua). Se agitó y se esperaron 10 minutos. Se les agregó 100 μ L de reactivo Folin al 50% con agitación simultánea, se dejaron a temperatura ambiente durante

30 minutos. Se utilizó como referencia una curva de concentraciones conocidas de BSA. La absorbancia fue determinada a 550 nm en un lector de placas Eon (Biotek).

Determinación de TRP

La presencia de triptófano fue determinada en las regiones cerebrales por cromatografía líquida de alta resolución, mediante un método de fase reversa (columna Eclipse AAA; Agilent) y una fase polar que contiene acetato de zinc 100 mM y acetonitrilo 3% en un pH final de 4.6 ajustado con ácido acético glacial. El método se lleva a cabo en un flujo de 1 ml/min con fase isocrática. El tiempo de retención de TRP fue en el minuto 4.9 y se detectó por fluorescencia a longitud de onda de emisión de 254 nm y 404 nm de excitación. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína.

Determinación de KYNA

La presencia de KYNA fue determinada en las regiones cerebrales por cromatografía líquida de alta resolución, mediante un método de fase reversa (columna HR-80; ESA, Thermo Scientific) y una fase móvil polar que contiene acetato de zinc 250 mM, acetato de sodio 50 mM y acetonitrilo 3% en un pH final de 6.2 ajustado con ácido acético glacial. El método se lleva a cabo en un flujo de 1 ml/min con fase isocrática. El tiempo de retención de KYNA fue en el minuto 7 y se detectó por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 344 nm y de emisión 398 nm. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína (Blanco-Ayala et al., 2015).

Determinación de L-KYN

La presencia de L-KYN fue determinada en las regiones cerebrales de interés por cromatografía líquida de alta resolución, mediante un método de fase reversa (columna HR-80; ESA, Thermo Scientific) y una fase móvil polar que contiene acetato de zinc 250 mM, acetato de sodio 50 mM y acetonitrilo 2.5% en un pH final de 6.2 ajustado con ácido acético glacial. El método se lleva a cabo en un flujo de 1 ml/min con fase isocrática. El tiempo de retención de L-kyn fue en el minuto 4 y se detectó por fluorescencia a una longitud de onda

de excitación de 365 nm y de emisión 480 nm. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína (Matin et al., 2006).

Determinación de 3-HK

Los niveles de 3-HK fueron determinados en todas las regiones por cromatografía líquida de alta resolución, utilizando un método de fase reversa (columna C18 para catecolaminas 3- μ m, 4.6 mm x 100 mm, Fisher Scientific, Hampton, Nuevo Hampshire, USA). El 3HK fue eluido a un flujo constante de 0.5 ml/min con una fase móvil (9% of trietilamina, 0.59% ácido fosfórico, 0.27 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 8.9 mM ácido heptano sulfónico. 40 μ l de la muestra fue utilizado para la cuantificación y detección por un método electroquímico (Heyes y Quearry, 1988).

Evaluación de la actividad de IDO

La evaluación de la actividad de IDO se llevó a cabo en cuatro regiones cerebrales (estriado, hipocampo, corteza y cerebelo). Brevemente, las regiones fueron homogenizadas en un buffer de fosfatos 50 mM (1:10 peso/volumen) pH 6.5. 100 μ l de los homogenizados fueron incubados con 100 μ l de coctel de ensayo (400 μ M de Trp, 20 mM de ascorbato (neutralizado), 10 μ M de azul de metileno, 100 μ g/ml de catalasa y 50 mM de buffer de fosfato de potasio pH 6.5) durante una hora a 37 °C en un baño maría con agitación, transcurrida la incubación se detuvo la reacción con 40 μ l de ácido tricloroacético (30%) y se calentaron las muestras a 65 °C durante 15 minutos. Las muestras se pusieron en hielo y posteriormente se centrifugaron a 6,000 x g durante 5 minutos. Se obtuvo el sobrenadante para posteriormente cuantificar L-KYN por HPLC como se mencionó previamente (Azadeh et al., 2006)

Evaluación de la actividad de KAT

La actividad de las KAT fue evaluada en las regiones cerebrales obtenidos (hipocampo, estriado, corteza y cerebelo). Las regiones fueron homogenizadas en un volumen de 9 veces el peso de cada región de buffer de homogenización (buffer tris-base pH8, piridoxal

5-fosfato, mercaptoetanol). Se tomaron 100 µl de ese homogenado y se le agregaron 100 µl de (L-KYN, piridoxal 5-fosfato, piruvato sódico, y buffer Tris-acetato pH 7.4), se incubó durante una hora a 37°C; se detuvo la reacción con 20 µl de TCA al 50% y 1 ml de HCl 0.1 M, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min, se obtuvo el sobrenadante y se inyectaron 20 µl al HPLC del mismo. La presencia de KYNA fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución como se describió previamente.

Evaluación de la actividad de KMO

La actividad de la KMO se realizó en cuatro regiones cerebrales (estriado, hipocampo, corteza y cerebelo). 100 µl de tejido fueron diluidos (1:4 vol/vol) en un buffer Tris-HCl (10 mM de KCl y 1 mM de EDTA). 80 µl de esa dilución del tejido fueron incubados con 100 µl de coctel de reacción (1mM de NADPH, 3 mM de glucosa 6-fostato, 1 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 100 µM de L-kyn, 10 mM de KCl y 1 mM de EDTA) en un volumen final de 200 µl durante 1 h a 37 °C. La reacción fue detenida con 25 µl de ácido perclórico al 6%. Las muestras se centrifugaron a 17000 g durante 10 min y 40 µl del sobrenadante fueron inyectados al HPLC (Zwilling et al., 2011).

35

Cuantificación de niveles de GSH

La evaluación de los niveles de GSH y GSSG en tejidos se realizó en las cuatro regiones cerebrales (hipocampo, estriado, corteza y cerebelo). El tejido fue homogenizado (1:10 peso/volumen). Se utilizó una técnica de fluorescencia en microplaca, utilizando O-ftaldehido (OPA). La fluorescencia fue evaluada a una longitud de onda de 365 nm de excitación y 430 nm de emisión en un lector de placas Eon (Biotek).

Estadística

Todos los valores están expresados como valores promedio $\pm$ error estándar de la media (S.E.M.) y se analizaron con una prueba t-student o una ANOVA de una vía seguido de una

prueba de Tukey utilizando el programa Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Los valores $p < 0.05$ o 0.01 se consideraron como significativos.

Los valores de los experimentos de funcionalidad celular se expresan en porcentaje, tomando el control como un 100 %.

Se realizó una correlación de Spearman entre las variables de los parámetros medidos en los ratones de 60 DPN.

RESULTADOS

Consumo de agua

El tratamiento de acetato de plomo (AcPb) se les dio a los ratones desde el día 0 hasta el día 23 postnatal por medio de la madre. No se observó diferencia alguna en el consumo de agua de ninguno de los dos grupos, se observó un incremento en el consumo de agua a los 16 días y eso fue debido a que las crías comenzaron a beber agua de manera independiente.

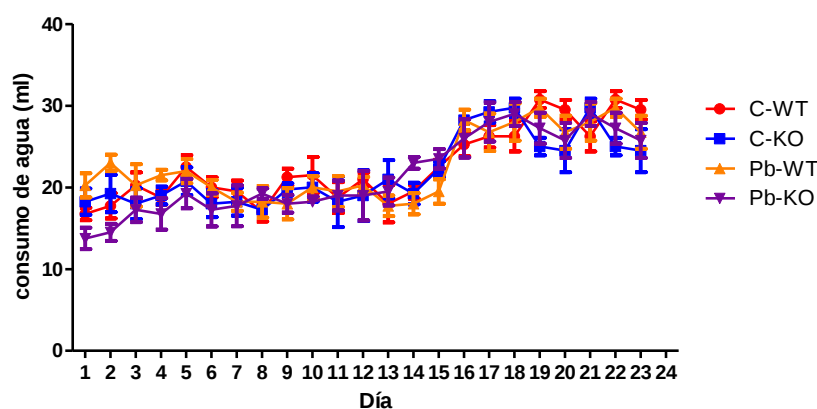


Fig. 1. Consumo de agua para cada uno de los tratamientos para los ratones WT y KO KAT II. Se presenta la media $\pm$ S.E.M. de 8 animales por tratamiento. Se realizó una t de student.

Determinación de plomo en regiones cerebrales de ratones intoxicados con AcPb durante la lactancia.

La concentración de Pb utilizada no tuvo efectos observables en mortalidad de crías ni efectos físicos observables. Los niveles encontrados en hipocampo, estriado, corteza y cerebelo fueron 23 ± 0.8 , 26.7 ± 5.6 , 24.1 ± 4.4 , 23.4 ± 2.8 $\mu\text{g Pb/ mg}$ de tejido, respectivamente en ratones intoxicados durante el período de lactancia. En los grupos control no hubo niveles de Pb detectables (Fig. 2).

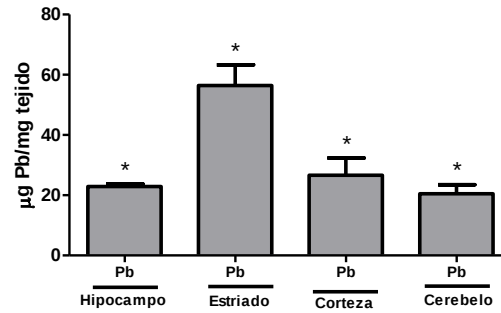


Fig. 2. Acumulación de plomo en regiones cerebrales de ratones intoxicados con AcPb (500 ppm) durante la lactancia. Se presenta la media $\pm$ S.E.M. de 4 animales por tratamiento. * $p < 0.01$ (a) valores significativamente diferentes al control de cada una de las regiones (niveles no detectables). Se realizó una t de student.

Efecto del plomo en la actividad motora de ratones intoxicados durante el período de lactancia.

Después del período de intoxicación de 23 días con AcPb (500 ppm). Se evaluó la actividad motora a los ratones de 23 DPN del grupo control y el intoxicado. Se observó que la intoxicación por AcPb (500 ppm) provocó una hipoactividad en los ratones tratados, ya que se observó una disminución en la distancia recorrida y el tiempo ambulatorio (Fig. 3).

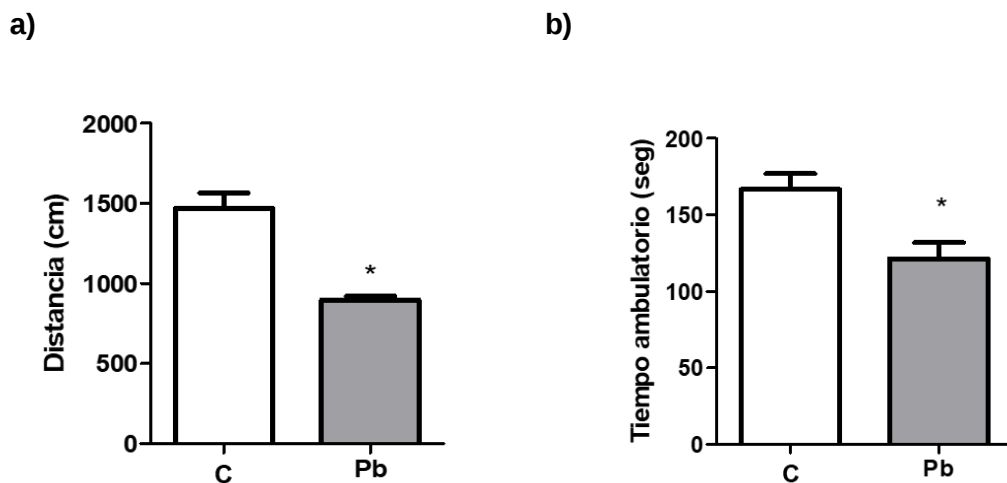


Fig. 3. Efecto del AcPb (500 ppm) sobre parámetros de la actividad motora en ratones. Distancia recorrida (a) y tiempo ambulatorio (b). Se presenta la media $\pm$ S.E.M. de 6-8 animales por tratamiento. * $p < 0.05$ (a) valores significativamente diferentes al control. Se realizó una t de student no pareada.

Efecto del plomo en marcadores de daño celular en tejidos de ratones intoxicados durante la lactancia

Una vez evaluada la actividad motora, se realizó el sacrificio de los ratones de ambos grupos para la evaluación de cuatro parámetros bioquímicos para evaluar el efecto del plomo en las regiones cerebrales. Los parámetros fueron: producción de especies reactivas del oxígeno (EROs), peroxidación de lípidos, funcionalidad celular y niveles de GSH. Se encontró que la presencia de plomo en las regiones cerebrales provocó un aumento de entre 50 y 70% en la producción de ERO comparado con el control. Se observó un incremento en la peroxidación lipídica desde un 35% en corteza y cerebelo, y de más de 100% en estriado e hipocampo. Además, se encontró una disminución de hasta un 50% en cerebelo y del 50 al 25% en estriado, corteza e hipocampo en la funcionalidad celular. Se observó una disminución en la cantidad de GSH sólo en el cerebelo (Tabla 1).

	23 DPN							
	Hipocampo		Estriado		Corteza		Cerebelo	
	C	Pb	C	Pb	C	Pb	C	Pb
ERO (mg de DCF/mg de proteína)	0.33 ± 0.03	0.57 ± 0.05*	0.85 ± 0.08	1.46 ± 0.08*	1.30 ± 0.09	1.52 ± 0.03*	0.79 ± 0.06	1.20 ± 0.07*
Peroxidación de lípidos (μmoles de MDA/mg de proteína)	0.037±0.001	0.077±0.008*	0.042±0.004	0.069±0.001*	0.026±0.002	0.036±0.001*	0.021±0.001	0.046±0.004*
MTT (% vs. Control)	100±5.1	65.77±4.77*	100±4.2	68.75±4.75*	100±5.0	48.05±5.55*	100±8.4	60.11±5.61*
GSH (nmol/g de tejido)	2689.72±84.72	2630.15±89.85	2485.13±184.87	2531.12±278.88	2541.32±51.32	2603.96±88.96	2742.99±52.99	2548.51±48.51*

Tabla 1. Efecto de la intoxicación por Pb en marcadores de daño celular y estado redox celular. La evaluación se realizó en hipocampo, estriado, corteza y cerebelo de ratones a los 23 DPN. Se presenta la media ± S.E.M. de 5-8 animales por tratamiento *p<0.05 (a) valores significativamente diferentes al control de cada región. Se realizó un t de student.

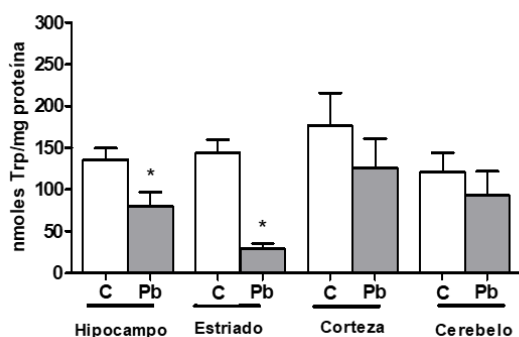
Efecto del plomo en los niveles de los metabolitos de la VK en ratones intoxicados con 500 pm de AcPb en período de lactancia

En las regiones cerebrales obtenidas se realizaron las cuantificaciones de los metabolitos de la VK.

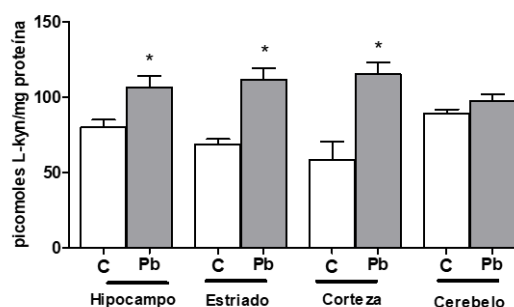
Para los niveles de TRP se observó una disminución sólo en hipocampo y estriado (entre el 50 y 75%) (Fig. 4a). Para L-KYN, el plomo produce un incremento en los niveles de este metabolito en los animales tratados en tres de las cuatro regiones cerebrales (del 20 al 50% corteza<estriado<hipocampo) (Fig. 4b).

Uno de los metabolitos de más importancia en procesos cognitivos ha sido el KYNA, por lo cual se evaluaron los niveles de este metabolito en los animales intoxicados con AcPb (500 ppm). Se observó que la presencia de plomo en las regiones cerebrales provoca un incremento de KYNA en todas ellas (hipocampo y estriado ~400%, corteza 450% y cerebelo 150%) (Fig. 4c) con respecto a su control. 3-HK, uno de los metabolitos del brazo largo de la VK muestra un incremento en hipocampo (100%), estriado (45%) y cerebelo (90%) de los animales intoxicados con Pb (Fig. 4d).

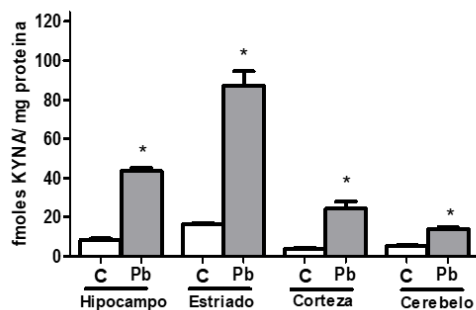
a)



b)



c)



d)

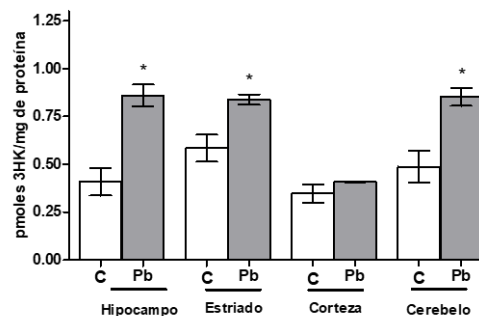


Fig. 4. Efecto del AcPb (500 ppm) sobre los niveles de Trp (a), L-KYN (b) KYN (c) y 3HK (d) en ratones de 23 DPN. Se presenta la media $\pm$ S.E.M. de 9 animales por tratamiento. * $p < 0.01$ valores significativamente diferentes al control de cada región. Se realizó una t- student no pareada.

Efecto del plomo en la actividad de las enzimas de la VK en ratones intoxicados con 500 pm de AcPb en período de lactancia

Una vez que se observó que el plomo indujo una alteración en los niveles de los metabolitos, se evaluó la actividad de las enzimas encargadas de la producción de estos metabolitos.

Se evaluó el efecto de la intoxicación por plomo sobre la actividad de la indolamina-dioxigenasa (IDO, encargada de la conversión de Trp a L-KYN, Fig. 5a) en donde no se encontró efecto alguno del plomo sobre esta enzima. Sin embargo, el efecto del plomo sobre la kinurenina monooxigenasa (KMO, enzima que convierte L-KYN en 3-HK) en animales de 23 DPN fue una sobre activación en todas las regiones evaluadas (de un 250% hasta un 500%) (Fig. 5b).

Dado que KYN es uno de los metabolitos de la VK relacionado con déficit cognitivo y al observar que los niveles de éste están alterados, se evaluó la actividad de la enzima KAT II, la encargada de la síntesis de este metabolito. Se observó que la intoxicación por plomo no ejerció ningún efecto sobre la actividad de esta enzima (Fig. 5c).

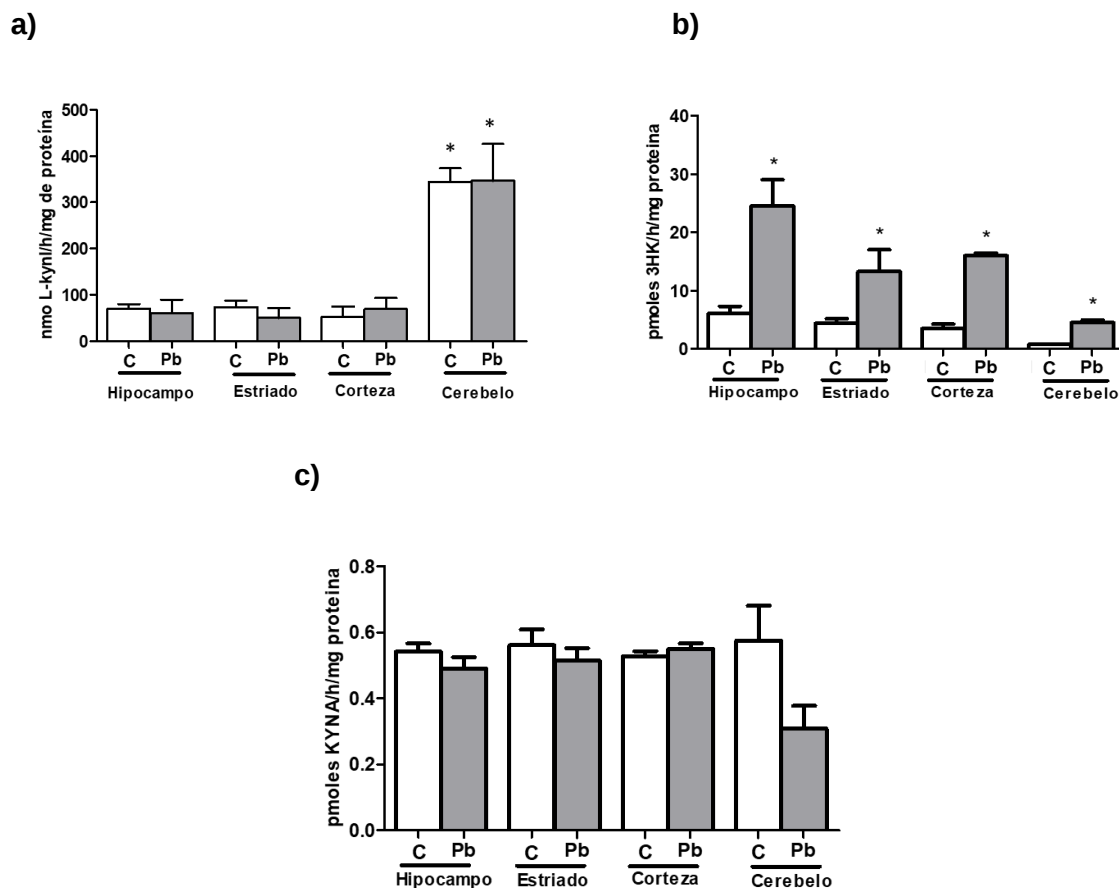


Fig. 5. Efecto de la intoxicación por AcPb (500 ppm) durante el período de lactancia sobre la actividad de IDO (a), KMO (b) y KAT (c) en ratones de 23 DPN. Se presenta la media $\pm$ S.E.M. de 9 animales por tratamiento. Se realizó una t- student no pareada.

Debido a que los ratones WT presentaron alteraciones en los niveles de los metabolitos de la vía de las kinureninas, especialmente en los niveles de KYNA y además mostraban hipoactividad, decidimos utilizar a los ratones KO KAT II, los cuales no tienen a la enzima responsable de la producción de este metabolito para así comprobar que el efecto que se observó sobre la conducta se debía por los niveles de KYNA y no por el propio efecto del plomo, el cual ya está ampliamente caracterizado en déficit cognitivo. Para esto, se utilizó el mismo modelo de intoxicación y al igual que en los ratones WT no mostraron diferencias en el consumo de agua (Fig. 1) pero sí en los niveles de acumulación de Pb en cada una de las regiones cerebrales evaluadas.

Determinación de plomo en regiones cerebrales de ratones KO KAT II

Para el grupo de ratones KO KAT II los niveles de Pb fueron 56.44 ± 7.1 , 20.46 ± 2.84 , 45.02 ± 3.6 , 31.06 ± 2.94 Pb/ mg de tejido para hipocampo, estriado, corteza y cerebelo. En los grupos control no hubo niveles de Pb detectables (Fig. 6).

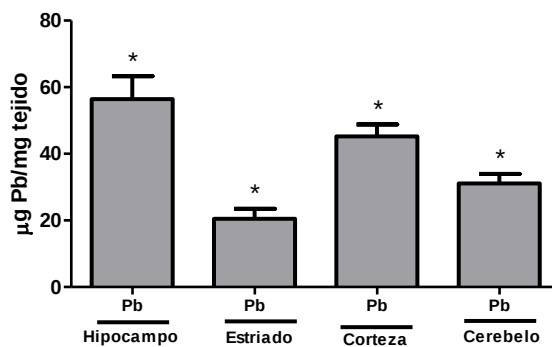
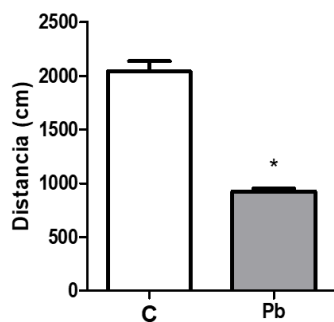


Fig. 6. Acumulación de plomo en regiones cerebrales de ratones KO KAT II de 23 DPN intoxicados con AcPb (500 ppm) durante la lactancia. Se presenta la media $\pm$ S.E.M. de 4 animales por tratamiento. * $p < 0.01$ valores significativamente diferentes al control (niveles no detectables). Se realizó una t de student no pareada.

Efecto del plomo en la actividad motora de ratones KO KAT II intoxicados durante el período de lactancia.

A estos ratones KO KAT II se les evaluó la actividad motora, al igual que en los ratones WT. Como se muestra en la figura 7, los ratones KO KAT II intoxicados en el período de lactancia presentan una hipoactividad igual a la de los ratones WT.

a)



b)

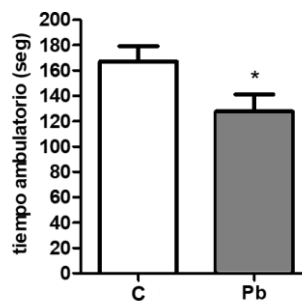


Fig. 7. Efecto del AcPb (500 ppm) sobre parámetros de la actividad motora en ratones KO KAT II de 23 DPN, distancia recorrida (a) y tiempo ambulatorio (b). Se presenta la media + S.E.M. de 6-8 animales por tratamiento. * $p < 0.05$ (a) valores significativamente diferentes al control. Se realizó un t de student no pareada.

Efecto del plomo en marcadores de daño celular en tejidos de ratones KO KAT II

Después de las pruebas de actividad motora, los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron las regiones cerebrales ya mencionadas para los grupos de ratones WT, donde se realizó la cuantificación de la cantidad de plomo. Se pudo observar que el plomo es capaz de almacenarse en las cuatro regiones evaluadas.

Aunado a esto, se realizó la evaluación de los parámetros bioquímicos para evaluar el efecto del plomo en las regiones cerebrales ya utilizados en ratones WT. Se encontró que la presencia de plomo en las regiones cerebrales provocó un aumento en la producción de EROs en todas las regiones evaluadas (30 a 60 % comparada con los controles), un incremento en la PL (del 60 al 100% más que en controles de todas las regiones cerebrales) y una disminución en la funcionalidad celular (del 35 al 50 %) en todas las regiones cerebrales de los ratones KO KAT II (Tabla 2).

	23 DPN-KO							
	Hipocampo		Estríado		Corteza		Cerebelo	
	C	Pb	C	Pb	C	Pb	C	Pb
ERO (mg de DCF/mg de proteína)	0.78 $\pm$ 0.02	1.2 $\pm$ 0.09*	1.21 $\pm$ 0.02	1.55 $\pm$ 0.07*	0.95 $\pm$ 0.03	1.32 $\pm$ 0.1*	0.97 $\pm$ 0.08	1.26 $\pm$ 0.07*
Peroxidación de lípidos (μ moles de MDA/mg de proteína)	0.135 $\pm$ 0.012	0.212 $\pm$ 0.018*	0.069 $\pm$ 0.001	0.140 $\pm$ 0.013*	0.067 $\pm$ 0.006	0.093 $\pm$ 0.003*	0.061 $\pm$ 0.008	0.083 $\pm$ 0.003*
MTT (% vs. Control)	100 $\pm$ 3.5	76.2 $\pm$ 2.0*	100 $\pm$ 5.1	61.8 $\pm$ 3.3*	100 $\pm$ 10.0	47.04 $\pm$ 5.56*	100 $\pm$ 4.2	50.78 $\pm$ 7.31*

Tabla 2. Efecto de la intoxicación por Pb en el ambiente redox. La evaluación se realizó en hipocampo, estríado, corteza y cerebelo de ratones KO KAT II a los 23 DPN. Se presenta la media $\pm$ S.E.M. de 5-8 animales por tratamiento *p<0.05 (a) valores significativamente diferentes al control de cada región. Se realizó un t de student no pareada.

Efecto del plomo en los niveles de los metabolitos de la VK en ratones KO KAT II intoxicados con 500 pm de AcPb en período de lactancia

Después de una intoxicación de AcPb (500 ppm) durante el período de lactancia se evaluaron los niveles de los metabolitos de la VK.

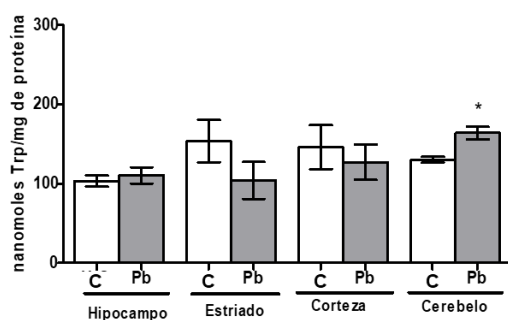
Una de las herramientas más importantes que se tiene para evaluar el efecto del plomo sobre la producción de KYNA fueron los ratones KO KAT II, por lo que se evaluaron los niveles de este metabolito en los animales intoxicados con AcPb (500 ppm).

Dado que los resultados conductuales fueron sorpresivamente iguales a los ratones WT. Caracterizamos los niveles de los metabolitos de la VK. Para los niveles de TRP se observó un incremento significativo sólo en cerebelo (20%, Fig. 8a). Para L-KYN, el plomo produce un incremento en los niveles de este metabolito en estriado y corteza cerebral de casi el 25% comparado con los controles (Fig. 8b).

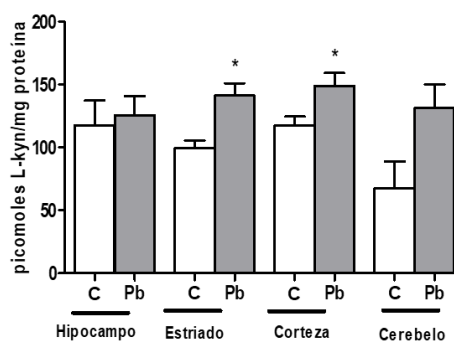
Inesperadamente, se observó que la intoxicación por plomo provocó un incremento de KYNA en las regiones cerebrales evaluadas de los ratones que carecen de la enzima principal encargada de la producción de este metabolito. El incremento fue significativamente alto en todas las regiones cerebrales (250 a 700%) comparadas con las regiones cerebrales de los ratones control (Fig. 8c).

3-HK es uno de los metabolitos del brazo largo de la VK y muestra un incremento en todas las regiones cerebrales evaluadas del 30 hasta el 200% (hipocampo<estriado<corteza<cerebelo) (Fig. 8d).

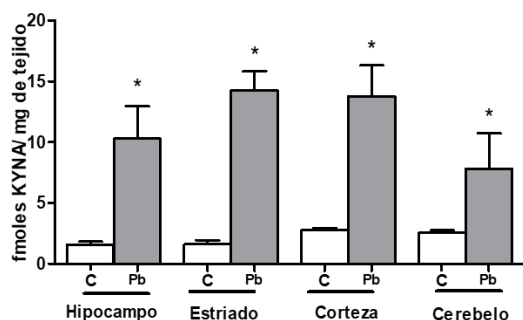
a)



b)



c)



d)

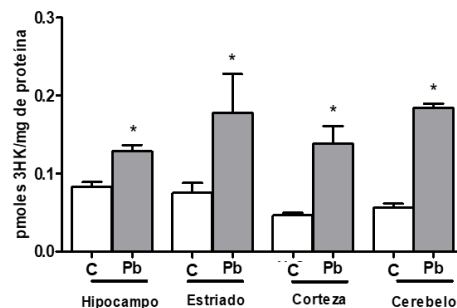


Fig. 8. Efecto del AcPb (500 ppm) sobre los niveles de Trp (a), L-kyn (b) KYNA (c) y 3HK (d) en ratones KO KAT II de 23 DPN. Se presenta la media $\pm$ S.E.M. de 5 animales por tratamiento. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control de cada región. Se realizó una t- student no pareada.

Efecto del plomo en la actividad de las enzimas de la VK en ratones KO KAT II intoxicados con 500 pm de AcPb en período de lactancia

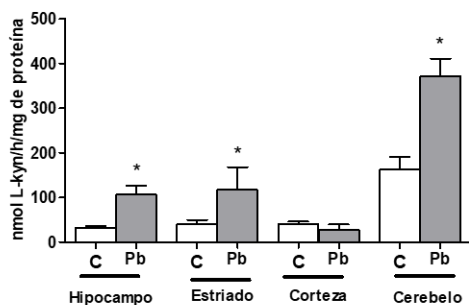
Una vez que se observó que el plomo indujo una alteración en los niveles de los metabolitos, se evaluó la actividad de las enzimas encargadas de la producción de estos metabolitos.

Se evaluó el efecto de la intoxicación por plomo sobre la actividad de la IDO, KAT y de KMO de ratones KO KAT II después de una intoxicación de 23 días con AcPb (500 ppm). La intoxicación por plomo provocó un incremento en la actividad de la IDO en hipocampo (200%), estriado (150%) y cerebelo (100%) (Fig. 9a)

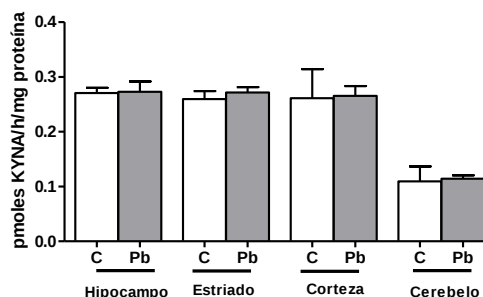
Dado que los ratones KO KAT II carecen de esta enzima y los niveles de éstos se mantienen bajos hasta los 28 días, fue sorpresivo encontrar alteraciones en los niveles de KYNA, por lo que se realizó el ensayo para la actividad de las KATs. Se observó que la intoxicación por plomo no ejerció ningún cambio en la actividad de esta enzima (Fig. 9b), lo cual era esperado puesto que son carentes de la enzima principal de la producción de KYNA.

Para la actividad de KMO, el plomo fue capaz de incrementar hasta un 350% la actividad de esta enzima en todas las regiones evaluadas (Fig. 9c).

a)



b)



c)

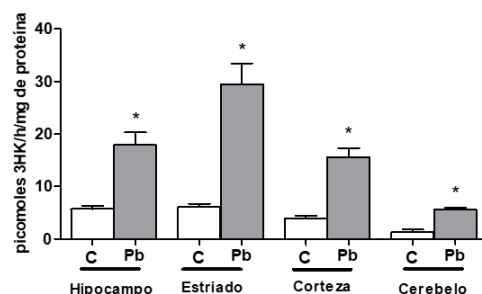


Fig. 9. Efecto del AcPb (500 ppm) durante el período de lactancia sobre la actividad de IDO (a), KAT (b) y de KMO (c) en ratones KO KAT II. Se presenta la media $\pm$ S.E.M. de 5 animales por tratamiento. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al control de cada región. Se realizó una t-student no pareada.

Efecto a largo plazo de la intoxicación por plomo durante la etapa de lactancia a los 60 días de edad de ratones WT

Debido a la temprana edad de los ratones evaluados no fue posible llevar a cabo las pruebas cognitivas en ellos, así que se utilizó un tercer grupo el cual fue intoxicado con 500 ppm durante 23 días (0 a 23 DPN), se interrumpió la intoxicación (al destete) y se les dio agua potable hasta los 60 días de edad. A estos ratones se les evaluó la actividad motora y la prueba del de alimento enterrado.

Efecto del plomo en la actividad motora de ratones de 60 DPN intoxicados durante la etapa de lactancia

En la evaluación de la actividad motora, la hipoactividad que se presentó en animales de 23 días intoxicados con 500 ppm durante el período de lactancia desaparece en animales de 60 DPN intoxicados con plomo durante esta misma lactancia (Fig. 10).

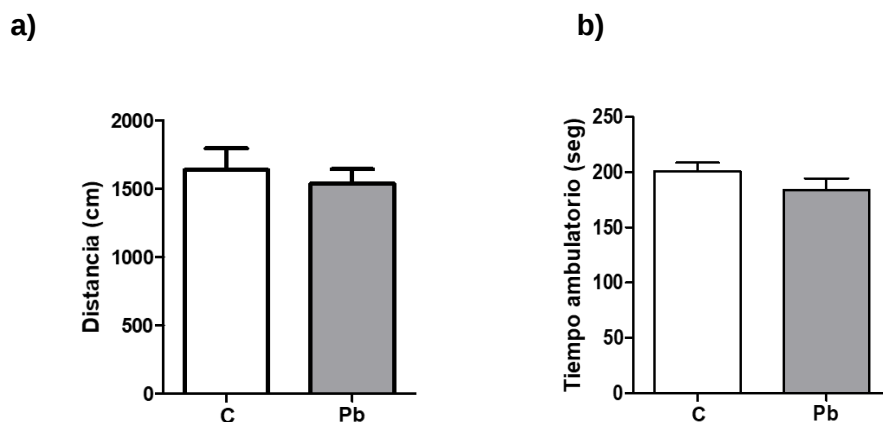


Fig. 10. Efecto de la intoxicación de AcPb (500 ppm) durante 23 días sobre parámetros de la actividad motora en ratones a la edad de 2 meses: distancia recorrida (a) y tiempo ambulatorio (b). Se presenta la media $\pm$ S.E.M. de 10-15 animales por tratamiento. Se realizó una t-student no pareada.

Efecto en memoria y aprendizaje de ratones WT intoxicados con plomo durante la etapa de lactancia

Posteriormente para evaluar aprendizaje y memoria de los ratones adultos intoxicados durante la etapa de lactancia, se llevó a cabo otra prueba llamada alimento enterrado.

La primera etapa es el entrenamiento de los ratones a lo largo de 7 ensayos donde se evaluó el aprendizaje; en esta etapa se cuantificó el tiempo en que lograban llegar al lugar de interés, después de haberle enseñado al ratón en qué lugar se iba a encontrar el pellet de alimento al que fueron habituados días antes. En esta etapa no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el intoxicado durante la etapa de lactancia en ninguno de los ensayos realizados (Fig. 11a). Sin embargo, en la segunda etapa donde se evalúa la memoria (24 h después y sin la presencia del alimento), mediante la cuantificación del tiempo y la distancia que tardaron en llegar al lugar de interés, se observó

que los ratones intoxicados durante la etapa de lactancia tardan más tiempo y recorren más distancia en llegar al lugar en donde se encontraba el alimento (Fig. 11b y 11c).

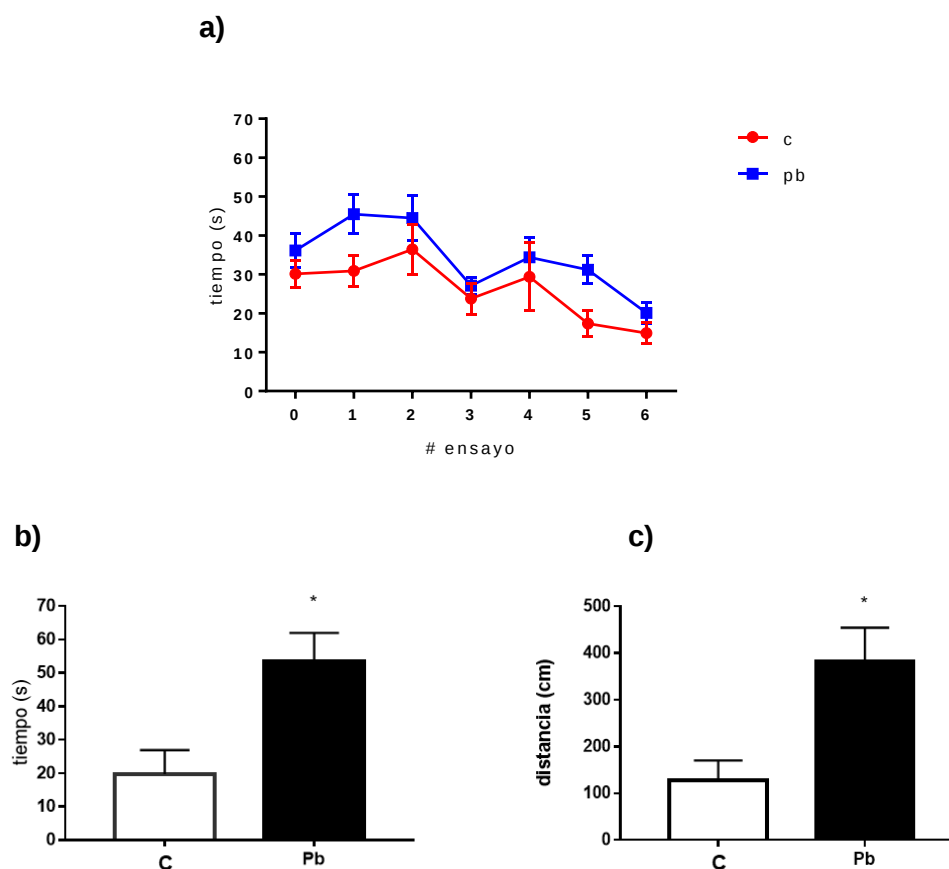


Fig. 11. Efecto de la intoxicación por plomo en la prueba de alimento enterrado en ratones de 60 días intoxicados con AcPb 500 ppm durante la lactancia. (a) Curva de aprendizaje con base en los ensayos realizados, (b) tiempo y (c) distancia utilizados por los ratones en llegar al sitio donde se encontraba el alimento un día después de los ensayos. Se presenta la media $\pm$ S.E.M. de 9 animales por tratamiento. * $p < 0.05$ valores significativamente diferentes al objeto conocido. Se realizó una t-student no pareada.

Efecto de la intoxicación con plomo durante la lactancia sobre la producción de EROs, PL, funcionalidad celular y niveles de GSH en ratones WT de 60 DPN

Una vez evaluada la cognición, los animales fueron sacrificados y fueron evaluados los mismos parámetros que los ratones de 23 días. Se evaluaron EROs, PL, funcionalidad celular y niveles de GSH. Se observó que el único parámetro que se mantiene desde los 23 días a los 60 días en que se evaluaron, fue la reducción del 50% de la funcionalidad

celular en todas las regiones, peroxidación lipídica en hipocampo y cerebelo y los bajos niveles de GSH en cerebelo (Tabla 3).

	60 DPN							
	Hipocampo		Estriado		Corteza		Cerebelo	
	C	Pb	C	Pb	C	Pb	C	Pb
ERO (mg de DCF/mg de proteína)	0.86±0.084	0.93±0.068	1.22±0.203	1.69±0.31	0.35±0.017	0.27±0.051	0.21±0.011	0.19±0.021
Peroxidación de lípidos (μmoles de MDA/mg de proteína)	0.42±0.057	0.737±0.143*	0.464±0.071	0.7±0.1	0.26±0.028	0.25±0.055	0.110±0.01	0.25±0.07*
MTT (% vs. Control)	100±4.2	50.76±5.74*	100±16	46.54±3.46*	100±4.1	53.38±3.62*	100±7.2	75.76±5.24*
GSH (nmol/g de tejido)	2583.66±111.34	2573.11±131.89	2146.92±233.08	2237.48±137.52	2323.63±66.37	2246.58±153.42	2668.05±91.95	2256.63±83.37*

Tabla 3. Efecto del AcPb (500 ppm) sobre la producción de EROs, PL, funcionalidad celular (a través de la reducción de MTT) y los niveles de GSH en ratones de 60 días, intoxicados del 0 al 23 DPN. Se presenta la media ± S.E.M. de 4 animales por tratamiento. *p<0.05 valores significativamente diferentes al control de cada tejido. Se realizó t-student no pareada.

Efecto de la intoxicación por plomo a largo plazo durante la lactancia sobre los niveles de los metabolitos de la VK en ratones de 60 DPN

Se evaluaron los niveles de los metabolitos de la VK en los ratones de 60 días intoxicados con plomo durante el período de lactancia. Se encontró un incremento en los niveles de KYNA, pero no en la misma magnitud que en los ratones de 23 días, el incremento fue del doble comparado con los controles (Fig. 12a). En los niveles de 3HK se encontró una disminución de este metabolito en estriado, corteza y cerebelo (150 hasta un 700% con respecto a su control) (Fig. 12b).

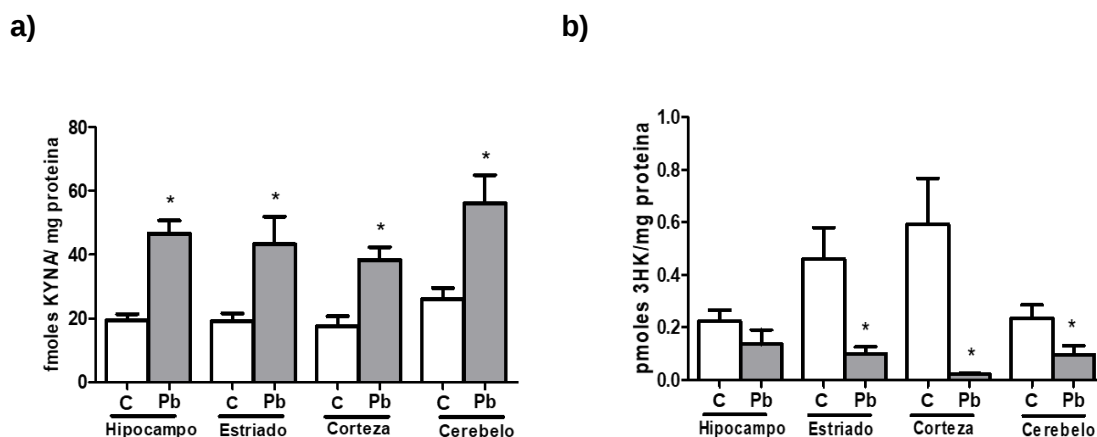
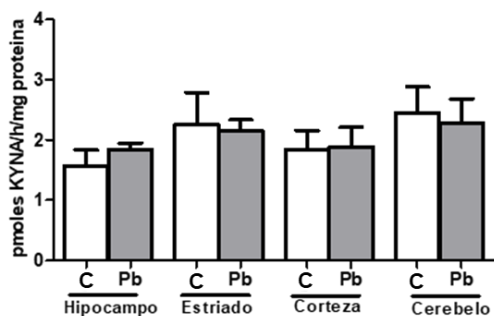


Fig. 12. Efecto del AcPb (500 ppm) sobre los niveles de KYNA (a) y 3-HK (b) en ratones de 60 días, intoxicados del 0 al 23 DPN. Se presenta la media $\pm$ S.E.M. de 8 animales por tratamiento. * $p < 0.01$ valores significativamente diferentes al control de cada tejido. Se realizó t-student no pareada.

Efecto a largo plazo del plomo sobre la actividad de las enzimas de la VK en ratones WT de 60 DPN intoxicados durante el período de lactancia

Se evaluó el efecto de la intoxicación de plomo a largo plazo en las enzimas de la VK. Se observó que el Pb no tuvo efecto alguno en la actividad de la enzima KAT (Fig. 13a). Por otro lado, se observó una disminución en la actividad de la KMO en hipocampo y corteza (80 y 200% respectivamente) de los tejidos de las regiones evaluadas (Fig. 13b).

a)



b)

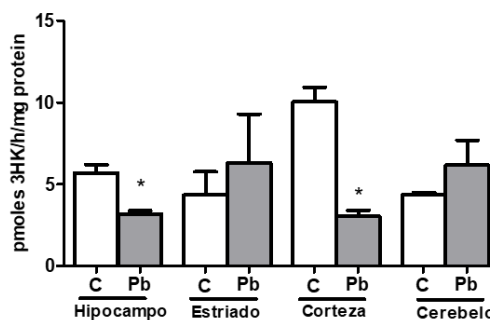


Fig. 13. Efecto del AcPb (500 ppm) sobre la actividad de KAT (a) y KMO (b) en ratones de 60 días, intoxicados del 0 al 23 DPN. Se presenta la media $\pm$ S.E.M. de 8 animales por tratamiento. * $p < 0.01$ valores significativamente diferentes al control de cada tejido. Se realizó t-student no pareada.

Con los resultados obtenidos del efecto a largo plazo de la intoxicación de plomo, se realizaron correlaciones de Spearman en donde se correlacionó cada par de variables en ratones de 60 DPN (niveles de 3-HK y de KYNA, así como los parámetros de tiempo y distancia obtenidos en la prueba de alimento enterrado). Se encontró una correlación entre los niveles de KYNA de todas las regiones cerebrales analizadas a los 60 DPN con el daño cognitivo evaluado por medio de la distancia y tiempo utilizado para alcanzar el lugar objetivo en la prueba de alimento enterrado (Fig. 14).

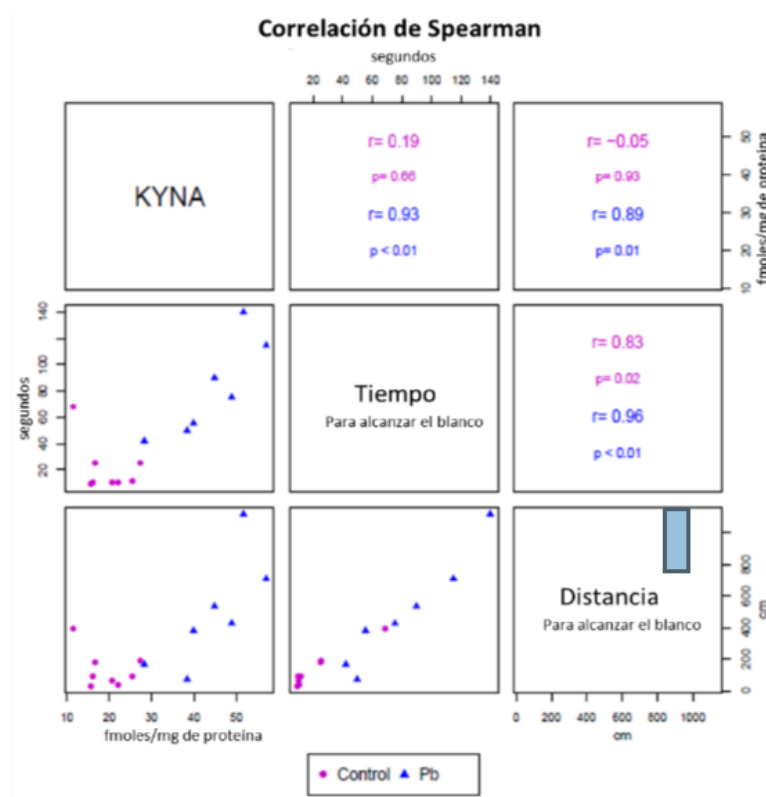


Fig. 14. Correlación de Spearman para ratones de 60 DPN intoxicados durante el período de lactancia. La matriz triangular inferior contiene el diagrama de dispersión para cada par de variables para ambos grupos (control y AcPb). La matriz triangular superior contiene el coeficiente de correlación de Spearman (r) y su valor p asociado (p) calculado para cada grupo.

DISCUSIÓN

El plomo es un metal pesado ampliamente utilizado para diversos procesos industriales por sus buenas características de maleabilidad, facilidad y bajo costo de extracción. De manera natural, este metal es parte de la corteza terrestre y, por su amplio uso la contaminación del medio ambiente por este metal se ha agravado con los años. La presencia de este metal no tiene ninguna función fisiológica en los seres vivos; sin embargo, es capaz de entrar y acumularse en diferentes tejidos de los organismos, en humanos: tejidos blandos, sistema nervioso central y en hueso. El principal mecanismo de toxicidad de este metal es mimetizar al ion calcio, muy importante en muchas vías de señalización celular; sin embargo, otro de los mecanismos es el desbalance del estado redox celular por medio de la producción de especies reactivas del oxígeno y el efecto negativo sobre sistemas antioxidantes (Garza et al., 2005; Wani et al., 2015; Villeda-Hernández, et al., 2001). Además, las consecuencias de

una intoxicación por plomo pueden ir desde alteración de la producción de células rojas, efectos sobre el desarrollo, cólicos, anemia, encefalopatía y hasta la muerte, todo esto depende de la concentración de plomo en sangre, haciendo énfasis que las mayores consecuencias se presentan en niños (Garza, et al., 2005). Debido a que ha sido bien descrito que la intoxicación con plomo altera el estado redox celular y conlleva a alteraciones cognitivas, este trabajo se enfocó en describir las alteraciones en el catabolismo del triptófano y su relación con el deterioro cognitivo inducido por la intoxicación por plomo, considerando que la principal vía de degradación del triptófano es modulada por el ambiente redox e inflamatorio, pero además teniendo en cuenta que los metabolitos producidos durante la degradación de triptófano están involucrados en la cognición debido a las propiedades de neuromodulación que se les atribuyen (Pocivavsek et al., 2011; Reyes et al., 2014).

Nuestros datos muestran que la intoxicación con plomo durante el período de lactancia (0-23 DPN) lleva a la acumulación de este metal en el sistema nervioso central, induciendo alteraciones motoras (hipoactividad) y alteraciones en el estado redox celular, a juzgar por el aumento en la producción de EROs, la PL y la disfunción celular encontrada en las diferentes regiones cerebrales evaluadas, parámetros que coinciden con la literatura (He et al., 2000). Para saber si el catabolismo del triptófano estaba alterado, el siguiente paso fue evaluar la producción de los metabolitos de la VK y la actividad de las enzimas de la vía. Lo que observamos fue que los niveles de TRP disminuyeron significativamente con respecto al control mientras que los niveles de KYNA y 3-HK aumentaron, sugiriendo que la presencia de Pb aumenta el catabolismo de este aa. esencial a través de la vía de las kinureninas. El siguiente paso fue evaluar las actividades enzimáticas para observar el efecto del Pb sobre ellas, se encontró un aumento en la actividad de KMO en las diferentes regiones cerebrales (2 a 5 veces con respecto al control), lo cual concuerda con el aumento en los niveles de 3-HK; sin embargo, la actividad de KAT no se vio alterada, sugiriendo que la producción de KYNA pudiese deberse a mecanismos no canónicos. Para comprobar esto y descartar que la producción de KYNA fuera debida a la vía canónica, decidimos utilizar como herramienta de experimentación a los ratones KO KAT II (KAT II, enzima a la que se le atribuye la mayor producción de KYNA). Los ratones KO KAT II intoxicados durante el período de lactancia con AcPb mostraron hipoactividad, y a pesar de no contar con la enzima KAT II se encontraron altos niveles de KYNA (de hasta 600%), apoyando la propuesta de que este metabolito se forma por rutas no canónicas. En este contexto,

estudios previos muestran rutas alternas de producción de este metabolito por medio de la interacción del precursor de KYNA, L-KYN y EROs (Blanco-Ayala et al., 2015). De acuerdo con nuestros datos el plomo produce un ambiente celular idóneo para que esto se lleve a cabo, es decir un aumento en EROs y en los niveles de L-KYN. Lo que podría explicar el incremento de los niveles de KYNA en los ratones carentes de la enzima principal de producción de este metabolito. Adicionalmente, se evaluaron los niveles de 3-HK los cuales aumentaron en todas las regiones cerebrales evaluadas, acompañado de un incremento en la actividad de KMO (la enzima responsable de sintetizarlo), en todas las regiones evaluadas de ratones KO KAT II. Estos hallazgos indican que la producción de ácido kinurénico exacerbada por la intoxicación por plomo durante la lactancia es debida a rutas no canónicas.

Para evaluar las alteraciones cognitivas inducidas por el plomo y su relación con el catabolismo del triptófano, se emplearon ratones de 60 DPN los cuales fueron intoxicados del 0 al 23 DPN con 500 ppm de AcPb. A este grupo de ratones, se les determinó la actividad motora, la cual no cambió con respecto al grupo control, pero si con respecto a los animales intoxicados bajo el mismo esquema evaluados a los 23 DPN, esto podría deberse a que se ha reportado que el efecto de la intoxicación por plomo disminuye niveles de algunos neurotransmisores como dopamina, disminuyéndolos de manera transitoria (durante el período de intoxicación), y provocando un efecto negativo sobre la actividad motora, la cual es restaurada junto con los niveles de dopamina cuando la intoxicación es retirada (NourEddine D. et al., 2005; Jason y Kellogg, 1981). Sin embargo, en la prueba de alimento enterrado los ratones intoxicados muestran una curva de aprendizaje muy similar a los del grupo control a lo largo de los 7 ensayos realizados, lo que nos lleva a concluir que en este modelo de intoxicación con Pb no tiene efecto sobre el aprendizaje de los ratones y lo que corrobora los efectos vistos y reportados en niños con niveles bajos de plomo en sangre, en donde evalúan sobre pruebas que el aprendizaje no se ve afectado (Lidsky y Schneider, 2006). Sin embargo, el Pb si tuvo un efecto sobre la memoria a largo plazo ya que los ratones intoxicados tardaron de 2 a 3 veces más tiempo y recorren más distancia en llegar al lugar objetivo (donde se encontraba el alimento), lo que nos lleva a concluir que una parte de la memoria de los ratones intoxicados con plomo se ve afectada, una memoria de trabajo que implica un aprendizaje como parte del proceso, lo cual concuerda con resultados previos en varios modelos de intoxicación con plomo y en estudios realizados en niños y adultos con niveles de plomo en sangre (Rao y Bairy, 2015;

Flores-Montoya et al., 2015; Lanphear et al., 2000). Observando que el plomo es capaz de provocar un deterioro cognitivo, evaluamos los niveles de las kinureninas; se observó que los animales intoxicados con plomo presentaron una elevación de los niveles de KYNA del doble, de manera enzima independiente ya que la KAT II tampoco presentó cambios en su actividad a esta edad, entonces podemos hablar que el efecto del plomo sobre los niveles de KYNA se mantienen aunque la intoxicación con Pb se haya retirado y que acompañado a esto los efectos cognitivos también se encuentran presentes; en cambio, los niveles de 3HK se encuentran disminuidos en las regiones cerebrales evaluadas acompañado de una disminución en la actividad de KMO.

Este trabajo nos demuestra que el plomo afecta el catabolismo del triptófano lo cual pudiera estar relacionado con las alteraciones en parámetros cognitivos. Con los resultados obtenidos podemos decir que el efecto en la cognición a largo plazo se puede deber a ambos mecanismos presentes, el plomo y los niveles altos de KYNA ya que ambos tienen un efecto sobre los receptores NMDA. Durante el desarrollo estos receptores tienen una de las funciones más importantes para la formación de conexiones neuronales (Yang et al., 2009) y la alteración en su activación puede llevar a déficits cognitivos y de memoria (Guilarte y Miceli 1992). Además, ambos parámetros pueden funcionar de manera aditiva, realizando un bloqueo excesivo durante las primeras etapas de desarrollo sobre el receptor NMDA que a largo plazo podría seguir llevándose a cabo por la presencia de altos niveles de KYNA. Cabe mencionar que de manera normal el KYNA disminuye de la etapa prenatal a la postnatal permitiendo la formación de redes neuronales, sin embargo en nuestras condiciones de toxicidad observamos que en las primeras etapas del nacimiento estos niveles de KYNA se encuentran altos por la presencia de plomo, lo que sugiere que la dinámica del desarrollo de las conexiones neuronales no se forman de manera adecuada, lo que puede llevar a un deterioro cognitivo que se mantiene a largo plazo, ya que desde etapas tempranas e importantes estas conexiones no se formaron (Sunyer et al. 2015; Parsons et al. 1998).

Además, considerando el efecto del plomo en la funcionalidad celular a largo plazo, nos sugiere que este metal causa muerte celular que, acompañado con altos niveles de KYNA y una disminución en receptores NMDA por la muerte celular, existiera a largo plazo un efecto que, aunque no es mayor la cantidad de KYNA que en ratones de 23 días, el efecto si es comparable por la presencia de menos receptores afectados por KYNA.

CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo que evalúa el efecto de un metal sobre la producción de los metabolitos de la vía, el cual demuestra que el plomo es capaz de alterar la producción de estos metabolitos de la vía de la kinurenina principalmente de KYNA, lo cual está relacionado con las alteraciones cognitivas inducida por la intoxicación con este metal durante el período de lactancia.

BIBLIOGRAFÍA

Akladios F.N, Nadvi N. A. , Park J. , Hanrahan, J.R., Kapoor, V., Gorrell, M.D., Church, W.B. (2012). Design and synthesis of novel inhibitors of human kynurenine aminotransferase-I. *Bioorg Med Chem Lett.* 22(4):1579-1581.

Ali S. F., LeBel C. P., Bondy S. C. (1992). Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*;13(3):637-48.

Allegri, G., C. V. Costa, A. Bertazzo, M. Biasiolo and E. Ragazzi (2003). "Enzyme activities of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in various species of animals." *Farmaco* 58(9): 829-836.

Andersen, J. K. (2004). "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?" *Nat Med* 10 Suppl: S18-25.

Azadeh Matin, Isla M. Streete, Ian M. Jamie, Roger J.W. Truscott, Joanne F. Jamie. (2006). A Fluorescence-based assay for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Analytical Biochemistry* 349. 96–102.

Babu MS, Gopal NV, Reddy KP. (2007). Post natal antioxidant enzyme activity of rat brain regions during developmental lead exposure. *J Environ Biol.* Jan;28(1):21-7.

Ballatori N. (2002). "Transport of toxic metals by molecular mimicry". *Environ. Health perspect.* 110 (supl5) 689-694.

Basha R, & Reddy GR (2010). Developmental exposure to lead and late life abnormalities of nervous system. *Indian J Exp Biol*, 48(7): 636–41. [PubMed: 20929048]

Bellinger DC, Stiles KM, & Needleman HL (1992). Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: A long-term follow-up study. *Pediatrics*, 90(6): 855–861.

Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL. (1997). GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'ménage à trois'. *Trends Neurosci.*;20(11):523-9.

Bertolino M, Vicini S, Costa E. (1989). "Kynurenic acid inhibits the activation of kainic and N-methyl-D-aspartic acid-sensitive ionotropic receptors by a different mechanism". *Neuropharmacology*. 28(5):453-7.

Blanco Ayala T, Lugo Huitrón R, Carmona Aparicio L, Ramírez Ortega D, González Esquivel D, Pedraza Chaverrí J, Pérez de la Cruz G, Ríos C, Schwarcz R, Pérez de la Cruz V. (2015). "Alternative kynurenic acid synthesis routes studied in the rat cerebellum". *Front Cell Neurosci.*18;9:178.

61

Braun JM, Froehlich TE, Daniels JL, Dietrich KN, Hornung R, Auinger P, & Lanphear BP (2008). Association of environmental toxicants and conduct disorder in U.S. children: NHANES 2001– 2004. *Environ Health Perspect*, 116(7): 956–62.

Braun JM, Hoffman E, Schwartz J, Sanchez B, Schnaas L, Mercado-Garcia A, Solano-Gonzalez M, Bellinger DC, Lanphear BP, Hu H, Tellez-Rojo MM, Wright RO, Hernandez-Avila M. Assessing windows of susceptibility to lead-induced cognitive deficits in Mexican children. *Neurotoxicology*. 2012 Oct;33(5):1040-7.

Cárdenas-Rodríguez N y Pedraza-Chaverri J. (2006). "Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos". *Educación química* 17(2); 164-173.

Chintapanti S, Pratap Reddy K, Sreenivasula Reddy P. (2018). Behavioral and neurochemical consequences of perinatal exposure to lead in adult male Wistar rats:

protective effect by *Centella asiatica*. *Environ Sci Pollut Res Int*. May;25(13):13173-13185

Coyle, J. T. and P. Puttfarcken (1993). "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders." *Science* 262(5134): 689-695

Devi CB, Reddy GH, Prasanthi RP, Chetty CS, Reddy GR. (2005). "Developmental lead exposure alters mitochondrial monoamine oxidase and synaptosomal catecholamine levels in rat brain." *Int J Dev Neurosci*. Jun;23(4):375-81.

Díaz Gómez, M. del P. (2011). *Alteraciones Neurológicas por Exposición a Plomo en Trabajadores de Procesos de Fundición, Soacha, 2009*. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología. Bogotá, Colombia.

DiNatale B. C., Murray I. A., Schroeder J. C., et al. Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicological Sciences*. 2010;115(1):89–97.

62

Dietrich KN, Ris MD, Succop PA, Berger OG, & Bornschein RL (2001). Early exposure to lead and juvenile delinquency. *Neurotoxicol Teratol*, 23(6): 511–518.

Du F, Schmidt W, Okuno E, Kido R, Köhler C, Schwarcz R. (1992). "Localization of kynurenine aminotransferase immunoreactivity in the rat hippocampus." *J Comp Neurol*. 1992 Jul 15;321(3):477-87.

Dwyer JB, McQuown SC, Leslie FM. (2009). The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol Ther*;122(2):125-39.

Ebuehi OA, Ayinde OC. (2012). Neurobehavioural and neurotoxic effects of L-ascorbic acid and L-tryptophan in lead exposed rats. *Nig Q J Hosp Med*. Oct-Dec;22(4):240-4.

Erhardt S, Schwieler L, Emanuelsson C, Geyer M. (2004). Endogenous kynurenic acid disrupts prepulse inhibition. *Biol Psychiatry*. 2004 Aug 15;56(4):255-60.

Fan Y, Zhao X, Yu J, Xie J, Li C, Liu D, Tang C, Wang C. Lead-induced oxidative damage in rats/mice: A meta-analysis. (2020). *J Trace Elem Med Biol*. Mar; 58:126443.

Flora S. J., Flora G., Saxena G. (2006) "Environmental occurrence, health effects and management of lead poisoning". In: Cascas SB, Sordo J, editors. *Lead Chemistry, Analytical Aspects, Environmental Impacts and Health Effects*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Publication pp. 158–228.

Flora S. J., Mittal M., Mehta A. (2008). "Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy". *Indian J. Med. Res.* 128: 501-23.

Flores-Montoya MG, Alvarez JM, Sobin C. 2015. Olfactory Recognition Memory Is Disrupted in Young Mice With Chronic Low-Level Lead Exposure. *Toxicol Lett* . Jul 2;236(1):69-74.

Gargouri M, Ghorbel-Koubaa F, Bonenfant-Magné M, Magné C, Dauvergne X, Ksouri R, Krichen Y, Abdelly C, El Feki A. (2012). Spirulina or dandelion-enriched diet of mothers alleviates lead-induced damages in brain and cerebellum of newborn rats. *Food Chem Toxicol*. Jul;50(7):2303-10.

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

Gaspar AF, Cordellini S. (2014). "Combination therapy for the cardiovascular effects of perinatal lead exposure in young and adult rats". *Arq Bras Cardiol*. 103(3):219-30

Glass HC, Pham TN, Danielsen B, Towner D, Glidden D, Wu YW. (2009). "Antenatal and intrapartum risk factors for seizures in term newborns: a population-based study, California 1998-2002." J Pediatr. 154(1):24-28.e1.

González Esquivel D, Ramírez-Ortega D, Pineda B, Castro N, Ríos C, Pérez de la Cruz V. Kynurenine pathway metabolites and enzymes involved in redox reactions. Neuropharmacology. 2017;112(Pt B):331-345.

Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Kortsha GX, Brown GG, & Richardson RJ (1999). Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's Disease. NeuroToxicology, 20(2-3): 239-248.

Goyer R. A. (1997). "Toxic and essential metal interactions." Annu Rev Nutr. 17:37-50.

Goyer RA, Mahaffey KR. (1972). Susceptibility to lead toxicity. Environ Health Perspect.; 2:73-80.

Gramsbergen JB, Hodgkins PS, Rassoulpour A, Turski WA, Guidetti P, Schwarcz R. (1997) "Brain-specific modulation of kynurenic acid synthesis in the rat" J Neurochem. 69(1):290-8.

Guilarte TR, Miceli RC.(1992), Age-dependent effects of lead on [3H]MK-801 binding to the NMDA receptor-gated ionophore: in vitro and in vivo studies. Neurosci Lett.;148(1-2):27-30.

Guidetti P, Amori L, Sapko MT, Okuno E, Schwarcz R. 2007. Mitochondrial aspartate aminotransferase: a third kynurenate-producing enzyme in the mammalian brain. J. Neurochem. 2007;102:103-111.

Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati PJ, Croitoru J, Brew BJ. (2001) "Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection". J Neurochem. 78(4):842-53.

Gunnarson, E., Axehult, G., Baturina, G., Zelenin, S., Zelenina, M., & Aperia, A. (2005). Lead induces increased water permeability in astrocytes expressing aquaporin 4. Neuroscience, 136(1), 105–114.

Han Q, Cai T, Tagle DA, Li J. Thermal stability, pH dependence and inhibition of four murine kynurenine aminotransferases. (2010). BMC Biochemistry. 2010;11:19.

Harding L. E., Harris M. L., Elliott J.E. (1998). Heavy and trace metals in wild mink (*Mustela vison*) and river otter (*Lontra canadensis*) captured on rivers receiving metals discharges. Bull Environ Contam Toxicol. Nov;61(5):600-7

He L., Poblentz A.T., Medrano C.J., Fox D.A. (2000). "Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondrial permeability transition pore. J. Biol chem. 275 (16). 12175-12184.

Herrera-Mundo N, Sitges M. (2010). "Mechanisms underlying striatal vulnerability to 3-nitropropionic acid". J Neurochem. 114(2):597-605.

Heyes M. P. (1990). "The kynurenine pathway and neurologic disease. Therapeutic strategies". Adv. Exp. Med. Biol. 398: 125-129.

Heyes MP, Quearry BJ. (1988). Quantification of 3-hydroxykynurenine in brain by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. J Chromatogr. 1988 Jul 15;428(2):340-4.

Hilmas C, Pereira EF, AIKO KAT IIndon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. (2001). "The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and

increases non- α 7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications". J Neurosci 1;21(19):7463-73.

Hirata F, Hayaishi O. (1971). "Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction" J Biol Chem. 25;246(24):7825-6.

Holzerová, E., & Prokisch, H. (2015). Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production?. The international journal of biochemistry & cell biology, 63, 16–20.

Hou S, Yuan L, Jin P, Ding B, Qin N, Li L, et al. A clinical study of the effects of lead poisoning on the intelligence and neurobehavioral abilities of children. Theor Biol Med Model. 2013;10:13.

Hu H (1998). Bone lead as a new biological marker of lead dose: recent findings and implications for public health. Environ Health Perspect, 106(4): 961–967

66

Jason K M, C K Kellogg. 1981. Neonatal Lead Exposure: Effects on Development of Behavior and Striatal Dopamine Neurons. Pharmacol Biochem Behavior. Oct;15(4):641-9.

Jusko TA, Henderson CR, Lanphear BP, Cory-Slechta DA, & Parsons PJ (2008). Blood lead concentrations <10 μ g/dL and child intelligence at 6 years of age. Environ Health Perspect, 116(2): 243–248.

Kvietys PR, Granger DN. (2012). Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. Free Radic Biol Med.Feb 1;52(3):556-592.

Lancranjan I, Popescu HI, GAvănescu O, Klepsch I, Serbănescu M. (1975). "Reproductive ability of workmen occupationally exposed to lead". Arch Environ Health. 30(8):396-401.

Laniyan TA, Adewumi AJ. (2020). Potential ecological and health risks of toxic metals associated with artisanal mining contamination in Ijero, southwest Nigeria. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2020 Apr 27;1-20

Lanphear BP, Dietrich K, Auinger P, Cox C. Cognitive Deficits Associated With Blood Lead Concentrations <10 microg/dL in US Children and Adolescents. *Public Health Rep* ;115(6):521-9.

Lapin, I.P. (1980). "Experimental studies on kynurenine as neuroactive tryptophan metabolites: past, present and future" *Trends Pharmacol Sci* 370(1): 410–413.

Lehmkuhl, A.M., Dirr, E.R. y Fleming S. M. (2014). "Olfactory Assays for Mouse Models of Neurodegenerative Disease". *Journal of Visualized Experiments. J. Vis. Exp.* (90), e51804, doi:10.3791/51804.

Leret M. L., Garcia-Uceda F., Antonio M. T. (2002). "Effects of maternal lead administration on monoaminergic, GABAergic and glutamatergic systems." *Brain Res Bull.* 15;58(5):469-73.

Lidsky T.I. y Schneider J.S. 2006. Adverse effects of childhood lead poisoning: The clinical neuropsychological perspective. *Environmental Research* 100 (2006) 284–293

Lockith G. (1993) "Blood lead levels in children". *Canadian Medical Association Journal.* 149:139–142.

Lugo-Huitron, R., T. Blanco-Ayala, P. Ugalde-Muniz, P. Carrillo-Mora, J. Pedraza-Chaverri, D. Silva-Adaya, P. D. Maldonado, I. Torres, E. Pinzon, E. Ortiz-Islas, T. Lopez, E. Garcia, B. Pineda, M. Torres-Ramos, A. Santamaria and V. P. La Cruz (2011). "On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress." *Neurotoxicol Teratol* 33(5): 538-547.

Mager E, M. Lead. (2012) in Homeostasis and toxicology of Non Essential Metals: Vol 31B. Fish physiology. Canada. Editores: M. Wood C., P. Farrell y J. Brauner.

Matin A, Streete IM, Jamie IM, Jamie JF. A fluorescence-based assay for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Anal Biochem.*;349(1):96-102.

Moroni, F., G. Lombardi, G. Moneti and C. Aldinio (1984). "The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several mammals and its cortical content increases during the aging process." *Neurosci Lett* 47(1): 51-55.

Mostafa GA, El-Shahawi HH, Mokhtar A. Blood lead levels in Egyptian children from high and low lead-polluted areas: impact on cognitive function. *Acta Neurol Scand.* 2009;120 1:30-7.

Nady Braidy, Gilles J. Guillemin, Hussein Mansour, Tailoi Chan-Ling and Ross Grant. (2011). Changes in kynurenine pathway metabolism in the brain, liver and kidney of aged female Wistar rats. *FEBS Journal* 278. 4425–4434

NourEddine D., Miloud S., Abdelkader A. (2005). "Effect of lead exposure on dopaminergic transmission in the brain". *Toxicology.* 207:363-8.

Okamoto H, Yamamoto S, Nozaki M, Hayaishi O. "On the submitochondrial localization of l-kynurenine-3-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun.* 26(3):309-14

Okuno, E. and R. Kido (1991). "Kynureninase and kynurenine 3-hydroxylase in mammalian tissues." *Adv Exp Med Biol* 294: 167-176.

Papanikolau C. N., Hatzidaki G. E., Belivanis S., Yzanakakis G.N., Tsatsakis M.A. (2005). "Lead toxicity update". A brief review. *Med Sci Monit* 11:RA329-36.

Pearson, S. J. and G. P. Reynolds (1992). "Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease." *Neurosci Lett* 144(1-2): 199-201.

Perkins MN, Stone TW. (1982). "An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid". *Brain Res* 9;247(1):184-7.

Phyu MP, Tangpong J. (2013). Protective effect of *Thunbergia laurifolia* (Linn.) on lead induced acetylcholinesterase dysfunction and cognitive impairment in mice. *Biomed Res Int*. 2013;186098.

Phyu MP, Tangpong J. (2014). Neuroprotective effects of xanthone derivative of *Garcinia mangostana* against lead-induced acetylcholinesterase dysfunction and cognitive impairment. *Food Chem Toxicol*. Aug;70:151-6.

Pinto, J, Boris F. Krasnikov, Steven Alcutt, Melanie E. Jones, Thambi Dorai, Maria T. Villar, Antonio Artigues, Jianyong Li y Arthur J. L. Cooper. 2014. Kynurenine Aminotransferase III and Glutamine Transaminase L Are Identical Enzymes that have Cysteine S-Conjugate β -Lyase Activity and Can Transaminate L-Selenomethionine. *J Biol Chem*. 2014 Nov 7; 289(45): 30950–30961.

Pocivavsek A, Wu HQ, Potter MC, Elmer GI, Pellicciari R, Schwarcz R. (2011). Fluctuations in endogenous kynurenic acid control hippocampal glutamate and memory. *Neuropsychopharmacology*;36(11):2357-67

Pounds JG, Long GJ, Rosen JF. (1991). Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ Health Perspect*.;91:17-32

Qian Han, Howard Robinson, Tao Cai, Danilo A. Tagle, y Jianyong Li. 2011. Biochemical and structural characterization of mouse mitochondrial aspartate aminotransferase, a newly identified kynurenine aminotransferase-IV. *Biosci Rep*. 2011 Oct 1; 31(5): 323–332.

Rao Barkur R, Bairy LK. 2015. Evaluation of passive avoidance learning and spatial memory in rats exposed to low levels of lead during specific periods of early brain development. *Int J Occup Med Environ Health*. 2015;28(3):533-44. doi: 10.13075/ijomeh.1896.00283.

Rojas-Castañeda JC, Vigueras-Villaseñor RM, Rojas P, et al. Alterations induced by chronic lead exposure on the cells of circadian pacemaker of developing rats. *International Journal of Experimental Pathology*. 2011;92(4):243-250.

Reyes-Ocampo J, Ramírez-Ortega D, Vázquez Cervantes GI, Pineda B, Montes de Oca Balderas P, González-Esquivel D, Sánchez-Chapul L, Lugo-Huitrón R, Silva-Adaya D, Ríos C, Jiménez-Anguiano A, Pérez-de la Cruz V. (2015). "Mitochondrial dysfunction related to cell damage induced by 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid: Non-dependent-effect of early reactive oxygen species production" *Neurotoxicology*. Aug 5;50:81-91.

Sandalio LM, Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, del Río LA. Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules (2013). *Subcell Biochem* 69:231-255.

Schwarcz R, Stone TW. (2016). The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology*. 112 (Pt B):237-247.

70

Schmidt W, P Guidetti, E Okuno, R Schwarcz. 1993. Characterization of Human Brain Kynurenine Aminotransferases Using [3H]kynurenine as a Substrate. *Neuroscience*. Jul;55(1):177-84

Selva, R., C. G. Ríos, N. G. Crisostomo, E. F. Garcidueñas, D. F. Briseño, L. Navarro and E. R. Martínez (2011). "Oxidative Stress and Neurodegenerative Disease, Neurodegenerative Diseases" - Processes, Prevention, Protection and Monitoring, Dr Raymond Chuen-Chung Chang (Ed.), ISBN: 978-953-307-485-6, InTech, DOI: 10.5772/28857. Available from: <http://www.intechopen.com/books/neurodegenerative-diseases-processes-prevention-protection-and-monitoring/oxidative-stress-and-neurodegenerative-disease>.

Seo J, Lee BK, Jin SU, Park JW, Kim YT, Ryeom HK, et al. Lead-induced impairments in the neural processes related to working memory function. *PLoS One*. 2014;9 8:e105308.

Sharifi AM, Mousavi SH, Jorjani M.(2010). "Effect of chronic lead exposure on pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 protein expression in rat hippocampus in vivo". Cell Mol Neurobiol ;30(5):769-74.

Sharma B, Singh S, Siddiqi NJ. (2014). "Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems". Biomed Res Int 640754.

Shih R, Glass T, Bandeen-Roche K, Carlson M, Bolla KI, Todd AC, & Schwartz BS (2006). Environmental lead exposure and cognitive function in community-dwelling older adults. Neurology, 67(9): 1556–1562.

Shih RA, Hu H, Weiss KO, KAT Ilpf MG, Schwartz BS.(2009). "Cumulative lead dose and cognitive function in adults: a review of studies that measured both blood lead and bone lead". Environ Health Perspect. 115(3):483-92.

Shukla, V., S. K. Mishra and H. C. Pant (2011). "Oxidative stress in neurodegeneration." Adv Pharmacol Sci 572-634.

Smithdt, W., Guidetti, P. Okuno, E. y Schwarcz, R. 1993. Characterization of human brain kynurenine aminotransferases using [3H]kynurenine as a substrate. Neuroscience. 1993 Jul;55(1):177-84.

Smythies, J. (1999). "The neurotoxicity of glutamate, dopamine, iron and reactive oxygen species: functional interrelationships in health and disease: a review-discussion." Neurotox Res 1(1): 27-39.

Stone, T. W. (1993). " Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids." Pharmacol Rev 45(3): 309-379.

Stone, T. W. (2001). "Endogenous neurotoxins from tryptophan." Toxicon 39(1): 61-73.

Stone TW, Darlington LG. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. (2002). *Nat Rev Drug Discov.*;1(8):609-20.

Stone, T. W. (2020). Does kynurenic acid act on nicotinic receptors? An assessment of the evidence. *J Neurochemistry*. Mar;152(6):627-649.

Sunyer J, Esnaola M, Alvarez-Pedrerol M, Forns J, Rivas I, López-Vicente M, Suades-González E, Foraster M, Garcia-Esteban R, Basagaña X, Viana M, Cirach M, Moreno T, Alastuey A, Sebastian-Galles N, Nieuwenhuijsen M, Querol X. (2015). "Association between traffic-related air pollution in schools and cognitive development in primary school children: a prospective cohort study" *PLoS Med.* 3;12(3).

Thangarajan S, Vedagiri A, Somasundaram S, Sakthimanogaran R, Murugesan M. Neuroprotective effect of morin on lead acetate- induced apoptosis by preventing cytochrome c translocation via regulation of Bax/Bcl-2 ratio. *Neurotoxicol Teratol.* 2018 Mar-Apr;66:35-45.

72

Timofeeva OA, Levin ED. (2011). Glutamate and nicotinic receptor interactions in working memory: importance for the cognitive impairment of schizophrenia. *Neuroscience.* 10;195:21-36.

Thomas SR, Mohr D, Stocker R. (1994) Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 269(20):14457-64.

Toscano CD, Guilarte TR. (2005). Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. *Brain Res Brain Res Rev*;49(3):529-54. Epub 2005 Mar 31.

Valko M, Morris H, Cronin MTD (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress". *Current Medicinal Chemistry* 12(10):1161–1208.

Villeda-Hernández J., Barroso-Moguel R., Méndez-Armenta M., Nava-Ruiz C., Huerta Romero R., Ríos C. (2001). "Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate". *Brain Res Bull.* 55:24-51.

Wani A., Ara A and Usmani J. (2015). Lead toxicity: a review. *Interdiscip Toxicol.* 2015; Vol. 8(2): 55–64.

Wang J, Simonavicius N, Wu X, Swaminath G, Reagan J, Tian H, Ling L (2006). Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J Biol Chem.* 2006 Aug 4;281(31):22021-8. Epub 2006 Jun 5.

Weisskopf MG, Hu H, Mulkern RV, White R, Aro A, Oliveira S, et al. Cognitive deficits and magnetic resonance spectroscopy in adult monozygotic twins with lead poisoning. *Environ Health Perspect.* 2004;112 5:620-5.

73

Wong J¹, Ray WJ, KO KAT Ilrnilova AY. (2011). Development of a microplate fluorescence assay for kynurenine aminotransferase. *Anal Biochem.*;409(2):183-8.

Wu HQ, Pereira EF, Bruno JP, Pellicciari R, Albuquerque EX, Schwarcz R.(2010) The astrocyte-derived alpha7 nicotinic receptor antagonist kynurenic acid controls extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex. *J Mol Neurosci.* 2010 Jan;40(1-2):204-10. doi: 10.1007/s12031-009-9235-2. Epub 2009 Aug 19.

Xue WZ, Yang QQ, Chen Y, Zou RX, Xing D, Xu Y, Liu YS, Wang HL. (2017) Kiwifruit Alleviates Learning and Memory Deficits Induced by Pb through Antioxidation and Inhibition of Microglia Activation In Vitro and In Vivo. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:5645324.

Yang Y, Zhou Q. (2009). Spine modifications associated with long-term potentiation.. *Neuroscientist*.15(5):464-76.

Yu P, Di Prospero NA, SapKO KAT II MT, Cai T, Chen A, Melendez-Ferro M, Du F, Whetsell WO Jr, Guidetti P, Schwarcz R, Tagle DA. (2004) "Biochemical and phenotypic abnormalities in kynurenine aminotransferase II-deficient mice". *Mol Cell Biol*. 24 (16):6919-30.

Zmarowski A, Wu HQ, Brooks JM, Potter MC, Pellicciari R, Schwarcz R, Bruno JP. (2009). "Astrocyte-derived kynurenic acid modulates basal and evoked cortical acetylcholine release". *Eur J Neurosci*.29(3):529-38.

Zwilling D, Huang SY, Sathyaikumar KV, Notarangelo FM, Guidetti P, Wu HQ, Lee J, Truong J, Andrews-Zwilling Y, Hsieh EW, Louie JY, Wu T, Searce-Levie K, Patrick C, Adame A, Giorgini F, Moussaoui S, Laue G, Rassoulpour A, Flik G, Huang Y, Muchowski JM, Masliah E, Schwarcz R, Muchowski PJ. Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. 2011. *Cell*. 145(6):863-74.