



03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

13
24.

**EFFECTOS GENOTOXICOS POR LA INHALACION
DE PLOMO Y CADMIO EN RATON**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

BIOL. MAHARA A. VALVERDE RAMIREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. EMILIO ROJAS DE CASTILLO

1987

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

Esta tesis se realizó en el Departamento de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Emilio Rojas del Castillo.

Y con el apoyo de una beca otorgada por DGAPA.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Emilio Rojas de Castillo, por sus enseñanzas, apoyo y sobre todo amistad, sin lo cual no hubiera sido posible haber llegado al final.

A los miembros del comité tutorial: Med. Cir. Fabio Salamanca, Dr. Alejandro García Carrancá, M. en C. Teresa I. Fortoul Van der Goes por sus valiosos comentarios y orientación para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado Dra. Patricia Ostrosky-Wegman, Dr. Raúl Mancilla, M. en C. Teresa I. Fortoul Van der Goes, Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez, por sus correcciones y sugerencias para la presentación del trabajo.

A las Biólogas Irma López Martínez e Ivonne Sánchez Cervantes por el desarrollo del modelo experimental de inhalación y su apoyo en la parte difícil.

Al Med. Cir. Adrian Rondan Zarate, Med. Cir. Silvia Antuna Bizarro por su apoyo en la microscopía electrónica.

Al Biólogo Francisco Pasos por su ayuda en la toma de las fotografías.

Al Med. Vet. y Zoo. Enrique Pinzón responsable del bioterio en la Facultad de Medicina UNAM.

Al Dr. Fernando Díaz Barriga por la ayuda en la determinación de los metales en los órganos

A mis compañeros del laboratorio que de alguna manera siempre estuvieron para hacer mucho más fácil el trabajo: Maricarmen, Monse, Silvia, Libia, Adriana, Ana, Ivan, Daniel, Rocio, Tzuytzuy, Luis, Lorena, Aurora.

A mis amigos incondicionales CGC, Gaby, Daniel, Libia e Ivan porque sin su apoyo lo habría dejado a la mitad.

A mis padres y familia
que siempre estan en mi corazón

A Emilio

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
Contaminación	2
Contaminación por metales pesados	3
Partículas suspendidas	4
Toxicología de metales (Aspectos generales)	5
Absorción	5
Piel	6
Pulmones	6
Tracto gastrointestinal	7
Distribución	7
Excreción	8
Efectos sobre la salud	9
Mutagenicidad, Genotoxicidad y Carcinogenicidad de metales	9
Plomo	11
Exposición	12
Ocupacional	12
Ingestión	12
Inhalación	12
Modelo metabólico (Farmacocinética).....	12
Absorción	12
Ingestión	12
Inhalación	12
Distribución	13
Sangre	13
Tejidos conjuntivos	13
Esqueleto	13
Excreción	14
Toxicidad del plomo	15
Protoporfirinas eritrocíticas libres (PEL)	16
Mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad	18
Cadmio	21
Exposición	21
Aire	21
Agua	22
Alimento	22
Suelo	22
Tabaco	22
Modelo metabólico (Farmacocinética).....	23
Absorción	23
Distribución	24
Excreción	25
Interacción del Cd con otras sustancias	25

Efectos sobre la salud	25
Manifestaciones agudas a la inhalación	26
Manifestaciones crónicas a la inhalación	26
Mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad	26
Vía de exposición aérea	27
Sistema respiratorio	27
Bronquiolo	28
Células de Clara	29
Biomarcadores	32
Electroforesis unicelular o Ensayo Cometa	33
Justificación	37
Hipótesis	37
Objetivo General	37
Objetivos Particulares	37
MATERIAL Y METODOS	38
Animales	38
Evaluación del efecto genotóxico mediante electroforésis unicelular....	40
Viabilidad	40
Procesamiento para evaluación morfológica	40
Método estadístico	41
RESULTADOS	42
Viabilidad	42
Determinación de metales	42
Genotoxicidad	43
Riñón	44
Hígado	45
Cerebro	45
Médula Osea	45
Epitelio nasal	46
Testículo	46
Leucocitos	46
Genotoxicidad y alteraciones ultraestructurales	47
Pulmón	47
Acetato de plomo	47
Cloruro de cadmio	48
Acetato de plomo y Cloruro de cadmio	48
DISCUSION	51
Acetato de plomo	51
Cloruro de cadmio	53
Acetato de plomo y Cloruro de cadmio	55
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFIA	58

RESUMEN

Entre los principales contaminantes ambientales se encuentran los metales y metaloides. Si bien, la principal vía por la cual se está en contacto con ellos es a través del aire, la vía de exposición inhalatoria ha sido pobremente estudiada a pesar de ser una fuente importante de ingreso de estos tóxicos al organismo, tanto para animales como humanos. Por ello, se ha desarrollado un modelo en ratón para estudiar las alteraciones que los metales producen en el pulmón, así como en otros órganos al ser inhalados (Salgado, 1992). Estudios experimentales han mostrado que tanto el plomo como el cadmio, administrados por esta vía alteran la estructura del bronquiolo (Salgado, 1992; Sánchez, 1994). Así mismo, empleando este mismo modelo, es posible identificar biomarcadores de efecto que pueden revelar un daño producto de la interacción o exposición a agentes xenobióticos y que pueden ser utilizados como indicadores tempranos de algún trastorno mayor como lo sería cualquier enfermedad (Gonsebatt, 1994). Para evaluar el efecto genotóxico se han utilizado varios biomarcadores de efecto tales como las aberraciones cromosómicas, los intercambios de cromátidas hermanas, micronúcleos, la síntesis no programada de ADN, las mutaciones génicas (Brusick, 1987) y recientemente la electroforesis unicelular (Singh, 1988), siendo ésta última una prueba de alta sensibilidad y aplicable a cualquier tejido disgregable.

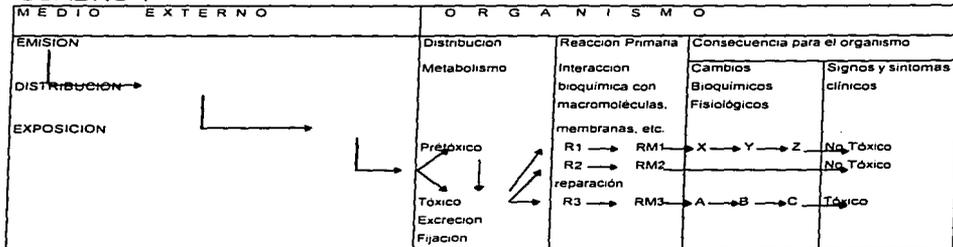
El objetivo de este trabajo es identificar la presencia de marcadores de daño genotóxico evaluado mediante la electroforesis unicelular por la exposición vía inhalatoria a plomo y/o cadmio y los mecanismos de acción individuales o combinados (sinergismo y antagonismo), no sólo en el órgano de ingreso al organismo (células del epitelio nasal y pulmón), sino en otros órganos que sirven como filtro, tales como el riñón, hígado; en un órgano en el que se ha reportado acumulación de metales pesados (cerebro), en un tejido en continua proliferación como lo es la médula ósea, también en sangre por ser un tejido en continua circulación en el organismo, así como en testículo donde podría valorarse un posible efecto reprotóxico. Los resultados obtenidos mostraron que mediante dicha vía de exposición tanto el plomo como el cadmio tienen la capacidad de inducir daño genotóxico en todos los órganos empleados, así mismo, se pudo detectar un mayor potencial genotóxico por parte del cadmio en comparación al plomo. También fue posible detectar diferentes órganos blanco para cada uno de los metales, así como para la mezcla de ellos, lo cual nos indica especificidad en la acción de dichos agentes. En cuanto a los cambios ultraestructurales de las células de Clara (encargadas de metabolizar agentes xenobióticos) en el pulmón se observaron alteraciones provocadas por cada uno de los metales y su mezcla, encontrándose además, una correlación con el daño al ADN evaluado en el pulmón a través de la electroforesis unicelular.

INTRODUCCION

Contaminación.

La contaminación ambiental es generada principalmente por la actividad antropogénica, las fuentes contaminantes de éste tipo se clasifican en fijas, móviles y naturales. Dentro de las primeras se encuentran las industrias que aportan el 20 % de los contaminantes atmosféricos totales y actividades comerciales tales como la refinera y otras. Las fuentes móviles más importantes de emisión de gases y partículas suspendidas en la ciudad de México son los vehículos, los cuales producen el 75% de los contaminantes. El 5% restante es producido por las fuentes naturales, son aquellas que mediante procesos naturales tales como la erosión y desertificación aportan contaminantes al ambiente (Sánchez, 1994), cabe mencionar que los metales forman parte de las tres fuentes contaminantes antes mencionadas. La forma química de las emisiones antropogénicas depende de la solubilidad de los productos y de la relación área-volumen-radio de las partículas. De este modo, las partículas menores de 5 μm de diámetro son relativamente solubles, tal es el caso de los nitratos, sulfatos y compuestos de amonio frecuentemente presentes en las emisiones producto de la combustión. La acción tóxica de los contaminantes está determinada tanto por su accesibilidad al organismo como por la serie de reacciones bioquímicas y fisiológicas que provocan y que en última instancia se manifiestan como signos y síntomas de intoxicación tal como se ve en el cuadro 1 (Vega, S. 1985).

CUADRO 1



Nota: La interacción entre el tóxico ambiental y el organismo está representada por varias fases interrelacionadas. En el cuadro la R representa una sustancia reactiva que interactúa con macromoléculas, membranas, etc., representados por la M. De esta interacción se pueden producir los cambios X, Y o Z que no tienen consecuencias tóxicas para el organismo, o los cambios A, B o C que tienen consecuencias tóxicas. Tomado de Vega, S. 1985)

Contaminación por metales pesados.

Los metales pesados son bioacumulados en diversas formas (inorgánica o como compuestos orgánicos y no son degradados ni biológica ni químicamente, como ocurre en el caso de la contaminación por compuestos orgánicos por lo cual, permanecen en el organismo por largos periodos, de ahí que sean una de las formas más peligrosas de contaminantes ambientales. Metales pesados como el cobre (Cu), plomo (Pb), mercurio (Hg), etc., forman complejos con diferentes iones y moléculas, ejerciendo toxicidad por su alta afinidad con los grupos amonio y sulfidrido (Martell, 1981). Al reaccionar los metales con estos grupos se forman complejos metálicos y como consecuencia de ello algunas enzimas pierden su efectividad para controlar reacciones metabólicas. La contaminación ambiental provocada por metales pesados ha ido en aumento debido a la actividad humana. Utilizando al pulmón como un indicador de exposición, se ha detectado la presencia de concentraciones elevadas de metales como Pb, cadmio (Cd), níquel (Ni), cobalto (Co) y Cu en residentes de la Ciudad de México, estos datos se muestran en la tabla 1 (Fortoul et al, 1996). Así como estudios experimentales en ratón con Pb y Cd inhalado en tratamientos agudos han demostrado cambios morfológicos en pulmón (Moncada, 1994).

Tabla 1. Niveles de diferentes metales ($X \pm SD$) en pulmones de individuos que murieron en la década de los 50's y 80's ($\mu\text{g/g}$ peso seco).

Metal	50's	80's
Cd	1.2 \pm 0.37	25.6 \pm 6.50
Co	3.0 \pm 0.97	37.2 \pm 8.67
Cu	10.0 \pm 2.97	44.8 \pm 15.7
Ni	3.0 \pm 0.96	57.6 \pm 9.3
Pb	12.0 \pm 4.97	134.3 \pm 26.7

Fortoul, 1996.

Las actividades industriales y urbanas generan metales pesados en forma de partículas y gases. Los niveles de metales pesados en la atmósfera, para el futuro, no sólo dependen del control y de la eficiencia del uso de combustibles fósiles y de las reservas minerales, sino también de la carga residual de metales en los depósitos globales, ésto repercute sobre el ambiente natural y por lo tanto en el hombre. Estos efectos provienen de dos grandes vías de exposición, 1) Transporte de contaminantes en el ambiente por el agua, suelos y comida, generados por la actividad antropogénica y 2) Alteración de las formas químicas o bioquímicas de los elementos (Goyer, 1991).

Partículas suspendidas.

Las partículas suspendidas son pequeños núcleos de polvo, agua, metales, silicatos, óxido de azufre y nitrógeno que se encuentran suspendidos en la atmósfera durante horas, días e incluso meses (Burgos, 1986). Desde el punto de vista de la salud, el porcentaje de la fracción respirable más importante es la de las partículas de diámetro entre 6 y 10 μm que quedan atrapadas en la cavidad nasofaríngea y partículas menores de 5 μm que pueden penetrar hasta el alvéolo (Wanner, 1993). Las partículas suspendidas más pequeñas son importantes en relación con la salud, no sólo porque permanecen en la atmósfera durante más tiempo que las partículas grandes, sino también porque algunas son lo suficientemente pequeñas para ser inhaladas y penetrar profundamente en las vías respiratorias (Loomis, 1996). De acuerdo al tamaño las partículas se clasifican en: partículas de fracción gruesa, (2.5 a 100 μm) y fracción fina (< 2.5 μm), ambos tipos presentan composiciones distintas. Existen dos mecanismos que determinan el tamaño, las de fracción fina provienen de procesos fisicoquímicos y las de fracción gruesa, son el resultado de procesos mecánicos, de combustión y otros procesos de tipo físico (Sánchez, 1994). En forma aproximada, las partículas en el rango de 0.1 a 10 μm son producto de la combustión (gasolina (Pb), cigarro(Cd)) y de aerosoles fotoquímicos (smog), incluyendo las partículas suspendidas provenientes de suelos, polvos emitidos por industrias como cementeras, fundidoras, hornos industriales y quema de basura, entre otros; las partículas mayores de 10 μm frecuentemente son el resultado de procesos como las tolvaneras y polvos de construcción, que por su tamaño, rápidamente se sedimentan permaneciendo poco tiempo suspendidas en el aire (Sánchez, 1994). La caracterización de las partículas suspendidas en el aire ambiental puede realizarse con base en la cantidad total de partículas o a la fracción respirable, que es de 0-5 μm de diámetro. Debido a que el grado de penetración y retención de partículas en el sistema respiratorio es una función directa del tamaño aerodinámico de las mismas (Fig. 1), es necesario conocer la distribución del tamaño del total de las partículas suspendidas y la fracción respirable ya que pueden tener efectos directos en la salud. En la tabla 2 se muestra el porcentaje de partículas respirables en función de su tamaño.

Tabla 2. Porcentaje respirable de partículas de diferentes tamaños.

Tamaño de partículas en μm	Porcentaje respirable
10	0
5	25
3.5	50
2.5	75
2	100

Sánchez, 1994.

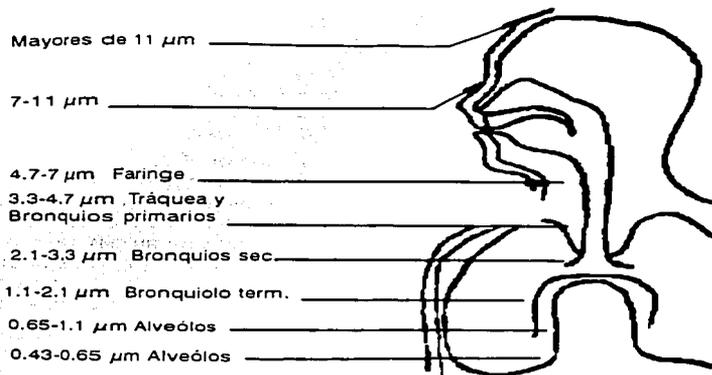


Figura 1.- Rangos de penetración de partículas en el sistema respiratorio.

Está bien establecido que las partículas suspendidas son un constituyente importante dentro de los contaminantes ambientales, al respecto Loomis en 1996 reporta que en la ciudad de México, hay un incremento en la mortalidad, asociada al incremento de los niveles totales de partículas suspendidas.

Toxicología de metales (aspectos generales).

El depósito de metales pesados en sistemas biológicos, puede ejercer toxicidad a diferentes niveles, dicha toxicidad puede ser dividida en cuatro fases: absorción, distribución, metabolismo y excreción (Timbrell, 1995).

Absorción.

Hay diferentes sitios de primer contacto entre el metal y un sistema biológico, la absorción necesariamente involucra el paso a través de la membrana celular del sitio de contacto. La estructura de las membranas biológicas determinan su función y características. La característica más importante desde el punto de vista toxicológico es que las membranas son selectivamente permeables. Solo ciertas sustancias son capaces de pasar a través de ella dependiendo de características

fisicoquímicas particulares como: tamaño, solubilidad en lípidos, similitud con moléculas endógenas, polaridad y carga eléctrica (Goyer, 1991 y Timbrell, 1995). Los pasos que una sustancia ajena sigue para atravesar las membranas biológicas son los siguientes:

- 1.- Filtración a través de los poros. Este movimiento puede ocurrir bajo un gradiente de concentración y puede incluir sustancias tales como etanol y urea.
- 2.- Difusión pasiva a través de la membrana fosfolipídica. Este es el mecanismo de absorción más importante por el cual se absorben tóxicos, para que se pueda llevar a cabo, se requieren ciertas condiciones (un gradiente a través de la membrana, que la molécula ajena sea liposoluble y no este ionizada).
- 3.- Transporte activo. Este proceso tiene algunas características importantes., se requiere de un transportador de membrana específico, energía metabólica para que opere el sistema, el proceso puede ser inhibido por drogas metabólicas, el proceso puede ser saturado a altas concentraciones de sustrato, el transporte se da en contra de un gradiente de concentración, además de que puede haber competencia por sustratos similares. Este tipo de transporte lo realizan sustancias y nutrientes endógenos, pero moléculas similares y iones pueden ser transportados por el sistema (fluorouracilo) (Timbrell, 1995).
- 4.- Difusión facilitada. Para que se realice, es necesario un transportador de membrana específico, se requiere un gradiente de concentración que cruce la membrana y además el proceso puede ser saturado por altas concentraciones de sustrato. Este tipo de transporte normalmente es realizado por sustancias y nutrientes endógenos, aunque también por compuestos ajenos con una similitud a los endógenos, un ejemplo al respecto es el transporte de glucosa en células intestinales.
- 5.- Fagocitosis y pinocitosis. Involucra la invaginación de la membrana para encerrar una partícula o gota respectivamente. Este es el mecanismo por el que las sustancias insolubles tales como el dióxido de uranio y asbesto son absorbidos en el pulmón.

Sitios de Absorción. Los tres principales sitios de absorción de metales son la piel, el pulmón y el tracto gastrointestinal. El tracto gastrointestinal es el más importante cuando la exposición fué por vía oral, el pulmón lo es en el caso de exposición vía inhalatoria, mientras que la piel es un sitio raro de absorción (Timbrell, 1995).

Piel. Esta se encuentra constantemente en contacto con compuestos ajenos tales como gases, solventes y sustancias en solución. La absorción a través de la piel está limitada a compuestos liposolubles tales como los solventes. Un factor importante que se debe considerar en cuanto a esta ruta de exposición es el área que representa (Timbrell, 1995).

Pulmones. Toxicológicamente esta vía es mucho más importante que la anterior, de primera instancia es el medio por el cual estamos en contacto con el aire y como se ha venido mencionando en él están presentes muchas sustancias

extrañas; estas pueden ser gases (monóxido de carbono), vapores de solventes (cloruro de metileno), aerosoles o partículas de diferentes clases. Los pulmones tienen una gran superficie, que es alrededor de 50-100 m² en el hombre, además de estar muy irrigada. Consecuentemente la absorción de los pulmones es rápida y eficiente. Dos factores que afectan la absorción vía pulmonar son el flujo sanguíneo y la velocidad respiratoria. Pequeños compuestos liposolubles, tales como solventes pueden ser absorbidos por los alveolos. Compuestos en solución y partículas pueden ser absorbidos por pinocitosis y fagocitosis respectivamente. Por ejemplo, partículas de dióxido de uranio, que son insolubles, son absorbidas vía pulmonar y causan daño en el riñón. El plomo en forma de partículas es absorbido por el pulmón, en este caso el tamaño de la partícula es un factor determinante para el localizar el sitio donde es depositado y por lo tanto absorbido, por ejemplo, partículas de plomo de 0.25 µm de diámetro son absorbidas pero partículas de dióxido de uranio de más de 30 µm de diámetro no se absorben.

Tracto gastrointestinal. Varios compuestos extraños son adquiridos vía alimenticia, por lo cual el tracto gastrointestinal es una importante vía de absorción. El ambiente interno del tracto gastrointestinal varía a través de su longitud, particularmente en cuanto a las condiciones de pH. Sustancias que son tomadas oralmente primero entran en contacto con el revestimiento de la boca (cavidad bucal), donde el pH es normalmente alrededor de 7 en el hombre, pero un poco más alcalino en especies como la rata. La siguiente región de importancia es el estómago, donde el pH es alrededor de 2 en el hombre y algunas otras especies de mamíferos (Timbrell, 1995). La sustancia puede permanecer en el estómago por algún tiempo. En el intestino delgado donde el pH es de 6 y que está muy irrigado, además de tener una gran superficie debido al plegamiento de su revestimiento y la presencia de bilis es un lugar propicio para la absorción de varios compuestos adquiridos por vía oral. Debido al cambio de pH en el tracto gastrointestinal, las diferentes sustancias que se encuentren en él, pueden ser absorbidas en diferentes regiones en función de las características fisicoquímicas que presenten, lípidos solubles, compuestos no ionizantes, pueden ser absorbidos a todo lo largo del tracto, pero sustancias ionizables generalmente solo pueden ser absorbidas por difusión pasiva si no son ionizadas en las condiciones de pH del sitio en el que se encuentran y sean liposolubles. Ácidos débiles pueden ser absorbidos en el intestino delgado debido a la influencia del flujo sanguíneo y pH del plasma. Un factor que puede afectar la absorción en el tracto gastrointestinal es la presencia de alimento (Clarckson, et al 1988). Este puede favorecer la absorción si la sustancia en cuestión es disuelta en alguna grasa presente. Otra variable importante está representada por las bacterias presentes en el tracto, puesto que tienen la capacidad de metabolizar algunas de las sustancias extrañas, así como también por enzimas presentes en la pared del intestino (Timbrell, 1995).

Distribución.

Después de que el metal o sustancia extraña ha sido absorbida, pasa al torrente sanguíneo. La absorción a través de la piel lleva a suministrar al compuesto al

torrente sanguíneo, mientras que la mayor circulación pulmonar será involucrada si el compuesto es aerotransportado y por lo tanto absorbido a través del pulmón. La mayoría de los compuestos absorbidos oralmente, serán suministrados a la vena porta del hígado mediante la sangre del tracto gastrointestinal. Solamente en el torrente sanguíneo, los compuestos serán distribuidos a todo el cuerpo y estarán diluidos en la sangre. Dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del compuesto, éste será distribuido a los diferentes tejidos. De la misma forma que el proceso de absorción y la distribución del compuesto a un tejido particular involucra el paso a través de membranas biológicas (Goyer, 1991; Timbrell, 1995). Solo los compuestos en formas no ionizadas pasarán del torrente sanguíneo a un tejido por difusión pasiva. Sistemas de transporte específico pueden operar por ciertos compuestos, fagocitosis y pinocitosis pueden transportar moléculas grandes (partículas o soluciones). La concentración del compuesto en el plasma y el nivel del perfil en el plasma será un reflejo de la distribución, por ejemplo, compuestos que son distribuidos a todos los tejidos, tales como solventes solubles en lípidos como el tetracloruro de carbono, presentarán una baja concentración en plasma, mientras que sustancias que son ionizadas al pH del plasma y que no necesitan ser distribuidas en tejidos, pueden tener altas concentraciones en plasma. El volumen de distribución puede algunas veces indicar si el compuesto de interés está en un tejido particular o si permanece en el plasma. Si una sustancia se distribuye a través del tejido adiposo, la concentración en el plasma será muy baja. Otro aspecto de la fase de distribución que puede tener una implicación toxicológica importante es la interacción del compuesto de interés con proteínas en el plasma y varias macromoléculas en otros tejidos. Muchos compuestos extraños unidos a proteínas plasmáticas no covalentemente, alteran su distribución (Timbrell, 1995). La distribución de la sangre en los tejidos es reducida por la unión de tales proteínas, puesto que ahora el compuesto de interés al estar unido a una molécula grande limita su paso por las membranas a menos que exista un sistema de transporte específico. Las uniones mencionadas involucran fuerzas iónicas, uniones de hidrógeno, uniones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals. Comúnmente los compuestos se unen a la creatinina, pero algunos como el DDT, que son lipofílicos pueden asociarse a lipoproteínas plasmáticas. La distribución de estos compuestos a tejidos en los cuales pueden encontrar su sitio de acción es de gran importancia para la toxicología de ellos. Compuestos lipofílicos localizados particularmente en cuerpos grasos, permanecerán en el mismo sitio por períodos prolongados, por lo cual ejercerán su efecto tóxico en ese sitio (Timbrell, 1995).

Excreción.

La eliminación de sustancias tóxicas por el cuerpo es un aspecto determinante de su efecto biológico, la rápida eliminación reduce la probabilidad de ejercer un efecto tóxico y por lo tanto reducen la duración de un efecto biológico (Fishbein, 1987). La eliminación de un compuesto extraño se refleja en el tiempo de vida media que presenta en el plasma, o en sangre entera. Sin embargo, el tiempo de vida media en el plasma también refleja metabolismo, distribución y excreción. El

tiempo de vida media en sangre entera es el tiempo requerido por el compuesto para ser eliminado del cuerpo y consecuentemente refleja la excreción del compuesto (Timbrell, 1995). La más importante ruta de excreción de muchos compuestos es a través del riñón y la orina. Otras rutas de secreción son la bilis, el aire expirado por los pulmones, secreciones del tracto gastrointestinal, leche, sudor y otros fluidos (Timbrell, 1995).

Efectos sobre la salud.

Se ha reportado poco sobre los efectos que causan los metales pesados a la salud. La mayoría de los síntomas que se presentan en las exposiciones agudas a estos elementos son muy parecidos, pudiendo causar vómitos, náuseas, irritación, mareos, etc. Sin embargo, también se ha reportado que algunos de estos elementos puede causar desórdenes, entre los más conocidos son: el síndrome de Wilson, el cual consiste en una alteración en la excreción hepática de cobre, por lo cual el metal es acumulado en el hígado, cerebro y otros órganos. Hemocromatosis por la ausencia de hierro, la enfermedad de Menkes, síndrome ligado al sexo donde la distribución del cobre se ve afectada (Harrison, 1983).

Mutagenicidad, Genotoxicidad y Carcinogenicidad de metales

Metales y metaloides como el magnesio (Mg), (Cu), zinc (Zn), Co, molibdeno (Mo), vanadio (V), estaño (Sn), Arsénico (As), selenio (Se), Cd, Ni y cromo (Cr) se requieren nutricionalmente por animales y humanos en cantidades de microgramos o miligramos diarios para crecer y realizar adecuadamente sus funciones biológicas se denominan elementos traza, o bien, micronutrientes. El estudio de los metales traza tiene algunos problemas entre los que se encuentra el establecimiento de los requerimientos óptimos diarios y su biodisponibilidad, puesto que solo ha sido posible determinar los niveles de toxicidad y los de deficiencia marginal, a través de estudios realizados en grupos de alto riesgo. Algunos metales están considerados dentro del grupo de los agentes xenobióticos, es decir, aquellos que son ajenos al organismo, entre los más estudiados se encuentran el Pb, Cd, berilio (Be), y Hg. De estos, algunos se han identificado como agentes genotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos (Fishbein, 1987; Ostrosky et al, 1990; Gonsbatt et al, 1994). De ahí la importancia de estudiarlos. La mayoría de los metales ejercen toxicidad en múltiples órganos blanco mediante enzimas de membranas celulares y de organelos (Goyer, 1991). Generalmente el efecto tóxico de los metales involucra la interacción entre un ion metálico libre y el blanco toxicológico; aunque es probable que sean varias las razones involucradas en el efecto tóxico. Las células involucradas en el transporte de metales son las gastrointestinales, las de hígado y las de los túbulos renales principalmente, sin embargo, para muchos metales estas células presentan mecanismos protectores que consisten en la formación de complejos proteinicos con el metal para desintoxicar (Goyer, 1991).

Numerosos factores influyen en la toxicidad a nivel individual: la edad, dieta e interacción metal-metal posiblemente afectan en la relación dosis-efecto. Por otro

lado la especiación química del metal puede ser un factor importante, en la absorción en términos de la distribución corporal y efectos tóxicos, estas interacciones pueden ser divididas por tener o no efectos carcinogénicos (Fishbein, 1987 y Goyer, 1991). La acción genotóxica de los metales se ha utilizado para determinar si dichos compuestos son potencialmente carcinogénicos. El término genotoxicidad se puede definir como la alteración producida en el material genético por ciertos agentes aún a concentraciones subtóxicas (Brusick, 1987). En las últimas dos décadas se han tratado de desarrollar pruebas genotóxicas de corta duración, que tengan una alta probabilidad de predecir cuales agentes químicos son carcinógenos en animales, sin embargo, las correlaciones no son directas.

Flessel y colaboradores (1978) revisaron los efectos de algunos metales inorgánicos en la prueba de Ames en *Salmonella*, el ensayo Rec, en *E. coli* y sus fagos, así como observaciones citológicas en organismos superiores, encontraron que en uno u otro sistema, metales como As, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Pt y Se fueron positivos. Sin embargo no se presentó un patrón uniforme en la correlación de estos resultados con carcinogénesis. En una compilación realizada por De Flora (1981), algunos compuestos del cromo tuvieron actividad en la prueba de Ames/*Salmonella*; pero disminuyó la actividad en presencia del sistema de activación metabólica, S-9. Posteriormente, Hansen y Stern (1984) así como Furst y Radding (1984) publicaron una revisión de la evaluación de metales a través de estos sistemas y una vez más no pudieron establecer correlación. Leonard y colaboradores (1984) revisaron la mutagenicidad y carcinogenicidad de un determinado número de metales industriales y listaron en orden decreciente de mutagenicidad algunos metales como : Cr, Be, As, Ni, Hg, Cd, Pb. También tomaron en cuenta el número de gente expuesta y listaron a los metales por su potencial carcinogénico de mayor a menor : As, Cr, Ni, Be, Pb=Cd=Hg, siendo los últimos tres prácticamente inactivos. Ennever y Rosenkranz (1986) evaluaron los resultados de varias pruebas de genotoxicidad de corta duración. Algunas pruebas demostraron que pocos iones metálicos eran mutagénicos.

Backer (1985) estudió el problema del porqué las pruebas genotóxicas de metales no son buenos indicadores de carcinogenicidad potencial y estableció que la falta de compatibilidad entre ensayos eucariontes y procariontes puede afectar en la correlación, debido a que frecuentemente se considera por igual los resultados obtenidos de éstos dos tipos de ensayo, sin considerar las diferencias en el metabolismo, organización del material genético, etc. o lo que es lo mismo, a la compartamentalización que presentan los eucariontes y no así los procariontes. Otro factor que puede estar influyendo es la naturaleza de los compuestos inorgánicos, incluyendo el estado físico y/o químico de los metales, su solubilidad, y la interacción con fosfatos en el medio. Backer (1985) concluye que las pruebas que detectan daño directo al ADN constituyen los mejores indicadores de carcinogenicidad potencial. Por ello es importante la evaluación de los metales por medio de pruebas que detectan daño al ADN como lo sería la prueba de aductos, la elución alcalina ó la electroforesis de células individuales, así como también es importante continuar desarrollando pruebas de genotoxicidad de corta duración más sensibles y precisas. Gebhart y Rossman (1991), reportan que la

mutagenicidad de metales en humanos solo ha sido demostrada en el caso del As, cromatos, Ni y platino. Concerniente a la carcinogenicidad por exposición ocupacional y su relación con datos epidemiológicos detallados, sólo fueron considerados carcinógenos el As, Be, Cd, Cr y Ni, cabe señalar que solo en ciertos estados de oxidación. Puesto que hay muchos datos que no han sido resueltos en cuanto a comutagenicidad y cocarcinogenicidad.

PLOMO

El plomo es un metal conocido por el hombre desde tiempos remotos; su descubrimiento y transformación han permitido la elaboración de algunos utensilios y herramientas desde el siglo XV a la fecha; sin embargo, su uso también ha significado riesgo por exposición directa lo cual se ha incrementado en la actualidad (Skerfving, 1988).

El Pb es un elemento que forma parte de la familia de los metales IV A, su número atómico es 82 y su peso molecular es de 207.19 daltones, su valencia es +1 o +2; esta considerado dentro del grupo de los metales pesados, tiene color azul grisáceo y en solución se comporta como catión divalente. En la naturaleza se encuentra incorporado a diversos compuestos que son obtenidos de forma impura y que requieren ser purificados, una vez obtenido se fracciona principalmente en dos compuestos: minio (monóxido de plomo) y litergirio (tetróxido de plomo), que son materia prima en la elaboración de varios productos. Es sabido que los egipcios usaban al plomo como material para estatuillas, utensilios de cocina, amuletos y monedas; durante todo el imperio romano se usó en tuberías para agua, adornos, material de cocina y recipientes para vino (Skerfving, 1988). En esta época ya se conocían algunos síntomas de intoxicación por plomo, pero fué hasta el siglo XII cuando se integró un listado de procesos patológicos asociados al uso del plomo, debido al uso de barro mal vidriado y al uso de plomo en la destilación de ron. A fines del siglo XIX aumentó la intoxicación por este metal cuando aparecieron los motores de combustión interna. En los últimos 50 años, el uso del tetraetilo de plomo como antidetonante en las gasolinas y en la elaboración de acumuladores generalizó el riesgo de contaminación ambiental, con la consecuente dispersión de los gases de motores que se depositan finalmente en los antidetonantes en las gasolinas, el producto de la reacción son el cloruro de plomo, sulfato de plomo, óxido de plomo y el plomo metálico que constituyen el polvo de plomo (Skerfving, 1988).

El plomo es un metal relativamente inerte con bajo punto de fusión y puede encontrarse naturalmente en toda la biosfera. Esta presente en la atmósfera y se origina por procesos naturales y actividad humana. Se ha propuesto que cada año los volcanes emiten de 1 a 6,400 toneladas métricas de Pb. La emisión de Pb por actividad humana ha sido estimada en 450,000 toneladas métricas al año. El 90% de emisión antropogénica en E.U. se debe a la combustión de gasolinas con Pb, y en menor grado por la combustión de carbón y desechos de aceites. El Pb ha sido ampliamente usado como un componente de pinturas, así como de diversos compuestos orgánicos presentes en combustibles (Mendoza, 1996).

Exposición

Las formas de exposición son la natural y ocupacional a través de la ingestión e inhalación, principalmente.

Ingestión. La exposición a Pb a través de la dieta, puede ser de 30 $\mu\text{g}/\text{día}$ hasta cientos de $\mu\text{g}/\text{día}$. El rango de ingesta mediante el agua de bebida es de 1 $\mu\text{g}/\text{día}$ hasta 3 $\text{mg}/\text{día}$. Con respecto a la exposición a Pb hay que considerar factores como el material del cual están hechos los contenedores tanto para agua como para alimentos, puesto que la cerámica vidriada implica una exposición adicional al Pb, así también, debe considerarse que el vino puede contener altos niveles del metal (Skerfving, 1988).

Inhalación. La exposición a través del aire algunas veces es tan baja como 0.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, correspondiendo a una cantidad inhalada menor a 2 $\mu\text{g}/\text{día}$. En algunas áreas puede ser mucho mayor a 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, lo cual corresponde a una exposición de aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{día}$. Con respecto a esta vía de exposición hay varios factores importantes, uno de ellos es el tamaño de la partícula, puesto que de ello depende su distribución en las vías aéreas, otro factor importante es la exposición vía inhalatoria a través del tabaco, puesto que el contenido de Pb en el cigarro es de 3 a 12 μg y aproximadamente el 2 por ciento de éste es inhalado por el fumador (Skerfving, 1988).

Ocupacional. Esta es una vía de exposición extra a las antes mencionadas, la cual afecta a sectores específicos de la población, por ejemplo trabajadores de minas, fundidoras, fábricas de pilas, acumuladores y vidrio, así como pintores (Mendoza, 1996).

Modelo Metabólico (Farmacocinética).

Absorción

Ingestión. En promedio se absorbe del 4 al 21 % de Pb ingerido si éste se encuentra en forma de alguna sal soluble, por otro lado se ha reportado que los niños tienen una mayor absorción gastrointestinal que los adultos, en los cuales la capacidad de absorción varía y depende de factores como si la ingesta es simultánea a calcio y fosfato los cuales disminuyen la absorción del Pb (Skerfving, 1988). En animales experimentales la ingesta de leche, hierro y vitamina D afectan la absorción. En ratas de alto peso, la absorción de Pb es menos eficiente que en las de menor peso (Skerfving, 1988).

Inhalación. El patrón de depósito del Pb inhalado en el tracto respiratorio es afectado por el tamaño de la partícula de aerosol inhalado, la velocidad de dispersión, estabilidad atmosférica y de la ventilación. Partículas con un diámetro aerodinámico mayores a 5 μm son depositadas en vías superiores, donde son removidas por mecanismos mucociliares y después son ingeridas. Una fracción

de este Pb posteriormente es absorbido por el tracto gastrointestinal. Partículas con un diámetro menor a 1 μm , son ampliamente distribuidas y depositadas en la región alveolar del pulmón. Esto significaría que individuos que respiran más con la nariz y que por lo tanto tienen una mayor depositación del Pb en ella, están menos expuestos que los que respiran más a través de la boca. En cuanto a las partículas de 0.5 μm , su depositación es baja, aproximadamente del 20 % (Skerfving, 1988).

Distribución.

Sangre. El Pb es absorbido por el plasma de la sangre, aunque se conoce poco al respecto, se ha asumido que el Pb en plasma consiste en una fracción mayor formada por un complejo proteína-Pb y una fracción difusible. La presencia de Pb en plasma es el resultado de una absorción reciente, puesto que el Pb es rápidamente equilibrado entre el plasma y fluidos extracelulares. Más lentamente, pero en cuestión de minutos, el Pb es transferido a las células sanguíneas. Dentro de la sangre el 99 % del Pb está contenido en las células rojas, y el 1 % restante en el plasma (Skerfving, 1988). En las células rojas se encuentra unido a la membrana celular, hemoglobina y otros componentes. La distribución relativa dentro de las células sanguíneas, depende de factores individuales y la intensidad de la exposición. El radio del Pb contenido en células rojas y plasma no es constante sobre los niveles de Pb-sangre. De esta manera, la fracción en plasma sube con un incremento en la concentración de Pb en sangre. Este detalle es de importancia para la distribución a otros órganos. Así, se sabe que no es cierto que los niveles de Pb en sangre entera tienen una relación con los niveles en otros órganos (Mendoza, 1996).

Tejidos blandos. El Pb absorbido por el plasma de la sangre es distribuido a distintos órganos. Entre los tejidos blandos, el hígado y el riñón alcanzan altas concentraciones. Por otro lado el Pb tiene la capacidad de atravesar la barrera cerebral y juzgando por experimentos en animales, el grado del Pb por atravesar al sistema nervioso es mayor en niños que en adultos. En animales experimentales no es constante la relación entre los niveles de plomo en sangre y tejidos blandos. De esta manera, la acumulación de Pb en hígado y riñón es mayor que en sangre, mientras que es baja en el sistema nervioso central. El sistema nervioso periférico puede acumular más Pb que el sistema nervioso central (Skerfving, 1988).

Esqueleto. Una gran proporción del Pb absorbido es incorporado al esqueleto. El esqueleto contiene más de 90 % de la carga corporal del Pb. El Pb contenido en el esqueleto no es distribuido homogéneamente. Por analogía con el calcio, es probable un pequeño y rápido intercambio del contenido de Pb en el esqueleto. Además, hay otros dos sitios donde se acumula Pb, uno es el contenido en hueso trabecular y el otro es el del hueso cortical (Skerfving, 1988). El esqueleto contiene aproximadamente 20% de hueso trabecular y 80% de hueso cortical, pero la superficie del área en los dos tipos de hueso es similar. Así, el cambio del

contenido del Pb en hueso trabecular es mucho más rápido que el del contenido de Pb en hueso cortical (Skerfving, 1988).

Excreción. El Pb es excretado a través de la orina y las heces. La excreción en orina, es a través de filtración glomerular y secreción tubular, como se ha indicado en varios estudios con animales experimentales. La excreción en orina sube de manera exponencial cuando incrementa el nivel de Pb en sangre. Esto puede ser debido a un incremento en la fracción de Pb en plasma con un aumento del nivel en sangre, aunque esta posibilidad necesita ser confirmada. Puesto que hay variaciones individuales en la excreción de Pb en orina a concentraciones similares en sangre (Skerfving, 1988). El Pb también es eliminado por excreción fecal endógena. A baja exposición, la excreción en heces es aproximadamente la mitad que en orina. El Pb también puede excretarse por el sudor, uñas, pelo y leche materna. El Pb tiene la capacidad de cruzar la barrera placentaria y causa exposición fetal. La distribución en el feto es igual a la del adulto (Preston, 1980). La acumulación de Pb en el cuerpo comienza desde el nacimiento y continúa a través de la vida. El rango de carga corporal total en adultos es de 60 a 140 mg, cuando el Pb es adquirido por vía gastrointestinal o pulmonar. Inicialmente se distribuye de la sangre a distintos órganos. Se ha propuesto que la distribución y modo de excreción consisten de tres compartimentos: El compartimento de transporte a corto plazo (sangre), el compartimento de almacenaje intermedio (tejidos blandos) y el compartimento de toda la vida (hueso) (Skerfving, 1988). La concentración de Pb en sangre y tejidos blandos puede tener un equilibrio dinámico, posterior a la exposición, pero en hueso el equilibrio puede nunca ser alcanzado. El tiempo de vida media del Pb en sangre es aproximadamente de 30 días y cerca de 17 años en el hueso, se estima que aproximadamente 9 µg de Pb son almacenados diariamente en hueso en individuos no expuestos ocupacionalmente. Diversos estudios de monitoreo de los niveles de Pb en sangre de individuos no expuestos ocupacionalmente reportan un promedio de 9.2 y 14.6 µg/dL. Se realizaron estudios con niños donde se consideraron variables como la edad, sexo, raza, nivel socioeconómico y grado de urbanización de la zona de residencia y se encontró que los niños negros tiene un mayor nivel de Pb (> 30 µg/dL) mientras que los niños blancos tuvieron menos nivel de Pb en sangre (> 25 µg/dL) (Skerfving, 1988). En los adultos los hombres presentan mayores niveles de Pb en sangre con respecto a las mujeres. En tejidos blandos, el riñón es generalmente el órgano en el cual se encuentra la mayor cantidad de Pb, seguido por el hígado, corazón y cerebro. El alto porcentaje de Pb almacenado en riñón es un reflejo del hecho que se excreta a través de filtración glomerular. El Pb que no es absorbido se excreta en orina y heces (Skerfving, 1988).

Rangos de inhalación de compuestos de Pb alquilado, tales como el tetraetilplomo (TEL) y el tetrametilplomo (TML) fueron estudiados en individuos voluntarios. Esta investigación encontró un depósito inicial en pulmón, con rangos del 31 al 51% y de esta cantidad 40% de TEL fué exhalado después de 48 horas y 20% del TML. Compuestos alquilados de Pb son rápidamente absorbidos por la piel y es posible alcanzar dosis letales por esta vía. TEL y TML son oxidativamente alquilados en microsomas de hígado a trietil trimetil metabolitos que son conocidos como fórm

tóxicas de éstos compuestos. Después de una exposición a niveles altos de Pb alquilado se ha determinado la presencia del metal en hígado, riñón y cerebro (Goyer, 1991). La ruta de eliminación del Pb inorgánico es la vía renal. En la población general, el depósito en pulmón de Pb ambiental es aproximadamente del 30 l 50 %, dependiendo de los factores antes mencionados, por otro lado se calcula que más del 90% del Pb ambiental depositado en tracto respiratorio es absorbido por la sangre. Por análisis de tejidos de autopsias no se ha encontrado depósito de Pb en tracto respiratorio de trabajadores ocupacionalmente y no ocupacionalmente expuestos (Skerfving, 1988). Utilizando al pulmón de autopsias como un indicador de exposición, se ha detectado la presencia de concentraciones elevadas de metales como Pb, Cd, Ni, cobalto (Co) y cobre (Cu) en residentes de la Ciudad de México, éstos datos se muestran en la tabla 2 (Fortoul, 1993). En cuanto a la absorción gastrointestinal en ratas adultas se ha determinado que la absorción es del 1 % o menos.

Toxicidad del plomo.

Actualmente se dice que no hay tejido u órgano que no sea afectado por el metal, su similitud con el calcio (ambos son iones divalentes en solución), hace que el organismo no sea capaz de distinguirlos fácilmente y de esta manera el plomo toma el lugar del calcio en varias funciones celulares como la contacción muscular, excitabilidad neuromuscular, desarrollo del hueso, permeabilidad de membranas, coagulación sanguínea, etc. (Mendoza, 1996).

Debido a su presencia en varios órganos, el plomo es uno de los metales más importantes en toxicología. La intoxicación por este elemento puede ser de origen laboral, accidental, alimentario o por contaminación ambiental; su absorción, distribución y eliminación se llevan a cabo de la siguiente manera: Las dos vías más importantes de intoxicación son el aparato digestivo y los pulmones, el paso por la piel es mínimo y en el aparato digestivo la absorción es baja. La vía respiratoria es la fuente principal de intoxicación (Skerfving, 1988). Por otra parte el tamaño de las partículas es fundamental, si el diámetro es de 0.01 μm todo el metal se absorbe, cuando el tamaño es mayor queda atrapado de diferentes formas en los diversos tejidos, siendo el tejido óseo donde se almacena el 90% de lo absorbido por el cuerpo, le siguen en orden descendente de absorción el hígado, riñón, músculo, arterias y cerebro (Goyer, 1991).

Las intoxicaciones por plomo se dan principalmente en personas que están laboralmente expuestas al metal, aunque el saturnismo por ingestión accidental ocurre con cierta frecuencia. Los síntomas de intoxicación por el plomo o saturnismo son: constipación severa, anorexia, encefalopatía aguda, dolor abdominal y vómito; en adultos hay hiperirritabilidad, constipación y dolor abdominal agudo; en niños se ha observado vómito intermitente y varios grados de anemia. Se ha reportado que la intoxicación por plomo puede provocar edema cerebral, ataxia, estupor y debilidad generalizada, coma y convulsiones; aún como terapia de quelantes los cambios en el sistema nervioso central son frecuentemente permanentes, hay hiperactividad y pérdida de la capacidad

motora fina, deficit en la inteligencia y las habilidades de asociación y coordinación visual y motora (Browder, et al 1973). En fetos de rata se ha encontrado que el cerebelo está severamente afectado: el crecimiento cerebral es retardado, se reduce la producción de ADN y se pierde peso cerebral al nacimiento; en humanos se reporta la influencia del plomo en la capacidad intelectual y en el comportamiento en los niños (Mahaffey, 1977 y Skerfving, 1988). Otros estudios llevados a cabo en rata hicieron evidente el bajo peso en órganos como el hígado y riñón en fetos, en el riñón se encontraron los túbulos renales dañados por el plomo que condujeron a aminoaciduria y glicosuria en las ratas, así como cambios renales crónicos (Timbrell, 1994).

En el aire de la Ciudad de México el Pb es el único metal que se mide en algunas de las estaciones de la red de monitoreo ambiental de dicha ciudad. Se refiere que en ciertas zonas, la norma Mexicana para este metal que es de $1.5\mu\text{g}/\text{m}^3$, es rebasada con regularidad. Estudios en escolares de esta ciudad indican que a pesar de las acciones tomadas para controlar los niveles de Pb en el aire, la concentración de este metal en sangre aún esta por arriba de los $10\mu\text{g}/\text{dl}$ y la fuente de ingreso más importante la representa el aire (Romieu et al, 1993 y Olaz et al, 1995).

En cuanto a la reproducción, en humanos se ha observado disminución en la fertilidad, abortos y mortinatos; los experimentos en rata han mostrado la presencia de adenomas y carcinomas renales asociados a malformaciones congénitas y mutagenicidad, además de una evidente disminución en la fertilidad (Browder, 1973). A nivel enzimático, el plomo ataca principalmente a las metaloenzimas como la deshidratasa o ferroquelatasa y provoca una disminución en la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en eritrocitos, aunque el monóxido de carbono también la inhibe y de éste modo pueden actuar de manera sinérgica (Zúñiga,1981). En la síntesis del grupo hemo se alteran algunos pasos para la unión con hierro, aumentando los niveles de ácido delta aminolevulínico (ALA) y de protoporfirinas eritocíticas libres (PELs), por inhibición de la deshidratasa del ALA y ferroquelatasa de la protoporfirina III, respectivamente, lo que conduce a anemia hemolítica; por último, el plomo cataliza la hidrólisis no enzimática de trifosfato de adenosina (ATP) e inhibe la incorporación de adenina al ARN (Martin, 1984). Todo esto ilustra la amplia gama de toxicidad que genera este metal en el organismo.

Tanto en adultos como en niños se pueden encontrar valores elevados de plomo en sangre (mayores de $10\mu\text{g}/\text{dL}$), PEL (mayores de $30\mu\text{g}/\text{dL}$) o de ALA en sangre u orina. El aumento en los niveles de absorción de plomo generalmente se refleja como un aumento en la concentración de este elemento en sangre, pero esta relación no siempre se observa. Los síntomas de la intoxicación por plomo siempre son los mismos y son resultado del daño metabólico que produce el metal en cada órgano o tejido, en algunos de ellos se conoce su acción específica y en otros se continúa investigando(Binder, 1992).

Protoporfirinas eritocíticas libres (PEL). Son compuestos cíclicos formados por la unión de 4 anillos pirrólicos enlazados por puentes metileno; forman complejos con iones metálicos unidos a los átomos de nitrógeno de los anillos

pirrólicos, como las metaloporfirinas compuestas del hemo en la hemoglobina y en la clorofila, se encuentran conjugados a las proteínas y pueden formar muchos compuestos importantes en procesos biológicos. Precisamente el sistema hemossintético es el blanco de acción tóxica del plomo, que inhibe la formación del hemo durante los últimos dos pasos, así como a las enzimas delta aminolevulinico deshidratasa y ferroquelatasa de la protoporfirina III, la intoxicación leve o severa por plomo resulta en una acumulación de la protoporfirina IX, aunque también se pueden encontrar niveles altos de PELs en enfermedades como la anemia por deficiencia de hierro y por protoporfiria, pero estas enfermedades se pueden descartar si no hay datos clínicos. La concentración de PEL en sangre aumenta exponencialmente cuando hay daño por plomo. Por esta razón, la determinación de la concentración de PEL en sangre se ha utilizado como un indicador de intoxicación por plomo de tal forma que se puede medir su concentración en una muestra de sangre y si se encuentra elevada, indica de manera directa los efectos metabólicos producidos por la absorción del metal. La protoporfirina IX es la que se detecta en mayor proporción (más del 96%) por medio de una prueba que se realiza en unos cuantos minutos y su reproducibilidad es casi el 100%, la prueba es considerada positiva cuando se encuentran valores de PELs mayores a 8 $\mu\text{g}/\text{dL}$ en sangre, pero sólo cuando rebasan los 30 $\mu\text{g}/\text{dL}$ se reconoce una franca intoxicación por plomo; la deficiencia de hierro también puede provocar aumento en PELs, pero valores de más de 190 $\mu\text{g}/\text{dL}$ en sangre, se encuentran exclusivamente en intoxicación por plomo o en la enfermedad genética de porfiria eritropoyética. Se ha reportado que los niveles elevados de PELs y ALA, que son precursores del grupo hemo, cuando hay daño por plomo y estos niveles preceden a la anemia en adultos. En niños, cuando hay intoxicación por plomo, se encuentra que si hay de 5 a 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$ en sangre se inhibe más del 40 % de la deshidratasa del ácido delta aminolevulinico, si los niveles son de 20 a 25 $\mu\text{g}/\text{L}$ y si los valores son de 40 a 50 $\mu\text{g}/\text{dL}$, entonces hay disminución en los niveles de hemoglobina. El mecanismo de toxicidad descrito es una de las principales bases para pensar que el plomo actúe no únicamente en una ruta biosintética específicamente, sino que hace suponer que muchos procesos celulares se encuentran afectados. El método desarrollado para poner en evidencia estas lesiones bioquímicas ha sido ampliamente estudiado para la ruta biosintética del hemo, hace 10 años se empezó a contar con más tipos de pruebas químicas para demostrar las lesiones en otras vías metabólicas, como la determinación urinaria de ALA y ácido vanililmandélico para hacer evidente la toxicidad a nivel de sistema nervioso central (Binder, 1992).

La ruta biosintética del grupo prostético hemo es muy sensible a los efectos del plomo. Dicha vía metabólica se inicia con la formación del ALA a partir de la succinil coenzima A y glicina, esta reacción es catalizada por la enzima delta aminolevulinico sintetasa, 2 moléculas de ALA se unen por acción de deshidratasa y forman una molécula de porfobilinógeno, primera estructura cíclica de la vía metabólica. El porfobilinógeno es un anillo tetrapirrólico sustituido y cuando 4 moléculas de éste se unen por acción de las enzimas porfobilinógeno desaminasa y uroporfirinógeno isomerasa, se forma el complejo conocido como porfobilinógeno III, el primero de una larga serie de anillos porfirínicos a que dá

origen (Martín, 1984). La descarboxilación del uroporrinógeno III por la enzima urogenasa da lugar al coproporfirinógeno III y éste, en varias reacciones de oxidación y descarboxilación origina a la protoporfirina IX, la que con adición de hierro por la hemosintetasa, produce finalmente al grupo hemo. Estas reacciones son llevadas a cabo en la mitocondria y en el citoplasma, dentro de la ruta del hemo, el paso de succinil coenzima A hacia ALA y de coproporfirinógeno III a protoporfirina IX son reacciones de posible inhibición por plomo, el paso de ALA a porfobilinógeno y de protoporfirina IX a hemo son reacciones de segura inhibición del metal (Mendoza, 1996).

El tratamiento para una persona intoxicada o con niveles elevados de plomo en sangre., es administrar agentes quelantes como el ácido etilendiamino tetra acético (EDTA), dimercaptol 2,3 dimercaptol 1-propanol British Anti-Lewisite (BAL) y la penicilamida. BAL se administra de manera secuencial con EDTA, la penicilamida se administra sola y recientemente se ha probado un fármaco llamado ácido 2,3-dimercaptosuccinico (DMS) que también es un quelante utilizado por vía oral, más potente y de mayor seguridad (Carbajal, 1984).

Mutagenicidad genotoxicidad y carcinogenicidad

El nitrato de Pb mostró ser mutagénico en V79. Los compuestos de Pb han mostrado mutagenicidad en bacterias (Skerfving, 1988). Resultados positivos y negativos se han reportado en aberraciones cromosómicas de organismos superiores por exposición a Pb (Skerfving, 1988). Se han reportado aberraciones (principalmente gaps y fragmentos) en ratones que se alimentaban con altas concentraciones de Acet-Pb por dos semanas, en cambio ratones expuestos a Acet-Pb en agua de bebida 1800 mg/L no mostraron incrementar la frecuencia de aberraciones cromosómicas. La actividad clastogénica in vivo del Pb es afectada por la dieta, estudios al respecto muestran que animales expuestos a Pb manteniendo niveles deficientes de calcio en la dieta, exhiben una alta incidencia de aberraciones cromosómicas que los expuestos a Pb con dietas estándares. Los compuestos de Pb son capaces de estimular la proliferación en epitelio y en túbulos renales y son considerados como mitógenos potentes. Así, como hay otros trabajos que sustentan que el Pb incrementa el índice mitótico (Skerfving, 1988). Se han reportado 280 trabajos en los que se asegura que el plomo afecta a los cromosomas, en 200 estudios se encontró que no, estas diferencias se debieron principalmente a la forma y tiempo de exposición, número de muestras analizadas, número de metafases observadas y el tiempo del cultivo de linfocitos, además de una posible influencia adicional de otros metales como el cadmio y zinc o metaloides como el arsénico, que también intervienen en los individuos expuestos (Gebhart, 1984). Wise, 1992 encontró un aumento en la producción de fracturas cromatídicas, cromosomas dicéntricos y figuras radiales cuando se aplicó una solución de cromato de plomo con partículas de 0.5 μm a fibroblastos humanos y células de ovario de hámster chino (CHO), el tamaño de las partículas encontradas en el tracto respiratorio bajo y los pulmones coinciden con el utilizado en este estudio.

Un estudio con Acet-Pb induce transformación neoplásica en células SHE. Compuestos de Pb han mostrado inducir la transformación celular en BALB/C 3T3 y en células Fischer 344 (línea embrionaria de rata) infectadas con el virus de leucemia murina de Rauscher, en cuanto a las células SHE se han mostrado resultados tanto positivos como negativos. El Acet-Pb aumenta la incidencia de transformación inducida por adenovirus de simio.

La interferencia de otros metales con Pb induce carcinogenicidad en animales de laboratorio. Más de 20 inyecciones ip. de hidroxacetato de Pb II en ratones de la cepa A combinado con un aumento proporcional de la concentración de Mg-Acet o Ca-Acet, incrementaron la frecuencia de adenoma pulmonar y en otras combinaciones no afectaron la frecuencia de otros tumores (Skerfving, 1988). Se ha demostrado que tratamientos vía alimenticia de 15 de Acet-Pb y de 0-6% Acet-Ca por 18 meses, después de 79 semanas de terminada la exposición se desarrollaron tumores de riñón en 45% de las ratas tratadas únicamente con Acet-Pb y 71% en ratas con tratamiento de Acet-Pb y Acet-Ca y 0% en ratas que sólo ingirieron Acet-Ca. De lo cual se concluye que el Acet-Ca incrementa la carcinogenicidad del Acet-Pb. Muchos de los resultados reportados en la bibliografía son inconsistentes en cuanto a la carcinogenicidad del Pb potenciada o inhibida por otros metales o iones como el Mg y Ca. Cuando se da tratamiento vía intramuscular, generalmente se producen tumores sólidos; con la administración intraperitoneal produce sarcomas y mesoteliomas en roedores. Mientras que la inhalación que es una vía más relevante no lo hace (Skerfving, 1988). La inyección intramuscular de cromato de Pb produce tumores. También se ha visto la carcinogenicidad del Acet-Pb, subAcet-Pb y fosfato de Pb en animales. Sin embargo los resultados no son convincentes debido a la falta de correlación con estudios epidemiológicos con humanos, donde incrementa la incidencia de tumores. Evidencias epidemiológicas no concluyentes proponen al Pb como un posible carcinógeno (Clarkson, 1988). Estudios con trabajadores de fundidoras y fábricas de baterías muestran un incremento significativo de mortalidad por cáncer de pulmón. Muchos de éstos datos son confundentes por el hecho de que hay individuos fumadores y no fumadores; así como el hecho de estar expuestos simultáneamente a otros metales tales como arsénico y cromo, ambos conocidos como carcinógenos de pulmón. Otro dato obtenido de trabajadores de fábricas de baterías fue la alta incidencia de cáncer renal (Skerfving, 1988). En contraste, con los estudios epidemiológicos, hay evidencias sustanciales de que el Pb induce carcinogenicidad en animales experimentales. Acet-Pb es carcinógeno en rata y ratón. Incrementa la incidencia de tumores principalmente en riñón, sin embargo se han visto también tumores en testículo, pulmón, pituitaria, prostata y glándula adrenal, así como también se han presentado gliomas cerebrales. Estudios con perros, hámster, conejo, mono no han tenido resultados positivos confiables; pero muchos de éstos estudios al ser de corta duración, no permiten la formación de tumores (Skerfving, 1988). Otros compuestos como el fosfato de Pb y el subacetato de Pb muestran una alta incidencia de tumores en animales, mientras que el nitrato de Pb no lo hace. El óxido de Pb fué clasificado como co-carcinógeno con el benzo (a)pireno en la inducción de tumores de pulmón de hámster sirio. Estudiando la dirección de

mecanismos de acción en la carcinogenicidad del Pb, los datos son inciertos. Hay hipótesis de que el Pb involucra la inducción de la proteína cinasa C. El Pb tiene alta afinidad por grupos tales como el imidazol, cisteína, sulfidrilos y el grupo amino de la lisina. El Pb puede interferir con procesos bioquímicos a través de alteraciones estructurales con la integridad de enzimas por disrupción de la unión enzima-sustrato (Skerfving, 1988). Numerosos estudios tienen descrita la interacción del Pb con enzimas intermediarias del metabolismo y muchos de los efectos tóxicos del Pb "in vivo" se atribuyen a modificaciones de procesos celulares. Alteraciones en la energía del metabolismo, en síntesis de proteínas y ácidos nucleicos pueden ocurrir por exposición a Pb, todo lo cual contribuye a la alteración del crecimiento celular y jugar un papel importante en la carcinogénesis (Skerfving, 1988). Estudios de rastreo de la distribución del Pb "in vivo" sugieren relativamente libre acceso y una distribución preferencial del Pb a mitocondria de varios tejidos. Una variedad de funciones mitocondriales son muy sensibles al Pb, incluyendo el desacople de la fosforilación oxidativa, inhibición de la oxidación del sustrato y modificación en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y transporte iónico, particularmente de calcio. El transporte activo del Pb en mitocondrias parece estar asociado con el sistema de transporte de calcio y puede interferir con la regulación mitocondrial de calcio (Skerfving, 1988). El calcio afecta la absorción y la distribución del Pb en tejidos, el Acet-Ca ha mostrado potenciar la capacidad carcinogénica del Acet-Pb. En otro tipo de estudios se indica que los iones Pb desestabilizan la doble hélice del ADN, sugiriendo una unión con las bases nucleotídicas (Skerfving, 1988). La unión preferencial del Pb con grupos fosfato se ha visto que ocurre principalmente con nucleósidos y nucleótidos particularmente ATP. El Pb se une al N⁷ de la guanina y también interactúa con pares A-T. Estudios "in vitro" sugieren que el Pb tiene efectos sobre la replicación y transcripción de ADN (Hartwig, 1994). El Acet-Pb inhibe la O⁶ metilguanina-ADN transferasa humana, que es una enzima responsable de la reparación por remoción de aductos del ADN promutagénicos. Esta inhibición puede revertirse por ditioneitol pero no por EDTA, sugiriendo que el Pb reacciona covalentemente con grupos nucleofílicos en las proteínas, principalmente en sitios de cisteína (Skerfving, 1988). La inhibición "in vivo" de la reparación de O⁶ alquilguanina en ADN puede proveer una amplificación de los efectos mutagénicos/carcinogénicos inducidos por agentes alquilantes; esto puede explicar el papel de promotor o carcinógeno que se le atribuye al Pb. En células HeLa no inhibe la síntesis de ADN y ARN cuando se emplea como Acet-Pb. Pero en núcleos aislados si ha mostrado inhibir la síntesis de ADN y ARN (Skerfving, 1988). El Pb es capaz de potenciar la incorporación de timidina ³H en ADN pulmonar, renal y hepático. Se ha reportado que el Pb es capaz de formar complejos con fosfatos de nucleótidos y ácidos nucleicos, así como de catalizar la hidrólisis no enzimática de nucleósidos trifosfatados.

Toda la información anterior indica que el plomo de alguna manera tiene la capacidad de interactuar con el material genético, pero hasta ahora, los estudios efectuados en animales de laboratorio y en el hombre tanto in vivo como in vitro, han dado lugar a resultados contradictorios (Formi 1980, Maki-paakkanen, 1981 y Hartwig, 1994).

CADMIO

El cadmio es un metal que forma parte de la familia II A, con número atómico de 48 y un peso molecular de 112.41 g. En la naturaleza se encuentra a una concentración de 0.15 a 0.2 ppm como greenockite (CdS), pero es producido comercialmente como subproducto en la producción de otros metales. El cadmio es metal dúctil, maleable de color blanco plateado, con mucho lustre y resistente a la corrosión, su densidad es de 8.65-20^o, con un punto de fusión de 321° C. Su valencia usualmente es de +2, y características químicas muy similares a las del zinc. Pocos compuestos tienen cadmio univalente (Clarkson, 1988).

Al hablar de fuentes de contaminación en el ambiente ocupacional es importante señalar que en el caso del cadmio éstas también son responsables de la contaminación ambiental general. Las actividades mineras, tanto para el cadmio como para otros metales, son la fuente más evidente y las que pueden causar las concentraciones más altas del cadmio, ya que este metal se encuentra frecuentemente incorporado en diversos minerales. La exposición no sólo es importante para los mineros, sino también para otros individuos no mineros que trabajen en las mismas instalaciones o cerca de ellas (Sánchez, 1994).

El cadmio está presente en las actividades industriales ya sea como componente de la materia prima, como es el caso de las industrias de baterías y colorantes, o como parte de los sub-productos del proceso, como es el caso de la obtención del zinc (Nordberg, 1988). En los casos en los que esta presente como materia prima, el cadmio puede generar concentraciones ambientales muy elevadas. Las industrias que han presentado mayor riesgo, por la presencia del cadmio, según su rama o tipo, son las siguientes: baterías, acumuladores, cables eléctricos, celdas fotoeléctricas, cloruro de polivinilo, colorantes de cadmio, equipos para llantas, equipos nucleares, fusibles, joyería, laminados a vapor, soldadura, tapones de extinguidores zinc (Galvao, 1987). Otras fuentes importantes de contaminación del ambiente general son la incineración de materiales de residuos, la combustión de carburantes fósiles y el uso de fertilizantes fosfatados. El cadmio y sus compuestos emitidos por las fuentes señaladas se distribuyen y se presentan de modo diferente según las características de los medios como el aire, agua, alimento, suelo (Nordberg, 1988).

Exposición.

En zonas urbanas el promedio de Cd en el aire es de 5 a 40 ng/m³. Los niveles recomendados por la conferencia gubernamental americana de higiene industrial es de 50 µg/m³ (óxido de cadmio). La exposición a Cd es a través de aire, agua, alimento, suelo y tabaco (Carson, 1986).

Aire. La forma química más importante en que el cadmio se presenta en el aire es como óxido de cadmio. En las grandes ciudades en donde hay actividades industriales importantes, se han encontrado concentraciones elevadas del cadmio en el aire de 0.05 a 30 µg/m³ en oposición a otras áreas no contaminadas en donde existen niveles de 0.001 a 0.005 µg/m³ (rurales) y 0.005 hasta 0.05 µg/m³

(urbanas). La presencia de cadmio en el aire adquiere interés cuando se piensa en los efectos de este contaminante para la salud humana, ya que puede penetrar al organismo por vía respiratoria y ser absorbido. En áreas contaminadas un individuo puede llegar a inhalar hasta 3.5 μg de cadmio al día (Galvao, 1987).

En el ambiente de trabajo la exposición vía aérea a Cd depende en gran medida de los procesos industriales. En este tipo de ambiente la principal exposición es mediante la vía inhalatoria, aunque la exposición oral también está presente a través de comida y bebida que se contamina por el ambiente de trabajo (Nordberg, 1988).

Agua. El agua en áreas no contaminadas presenta concentraciones muy bajas de cadmio 0.001 hasta 0.115 $\mu\text{g/L}$ en océanos y alrededor de 1 $\mu\text{g/L}$ en ríos. En las regiones donde hay contaminación por cadmio estas concentraciones se pueden elevar mucho; así se han encontrado niveles de 0.004-0.3 $\mu\text{g/L}$. La importancia de estas concentraciones en el agua varía según la utilización que a esta el hombre le dé (Sánchez, 1994).

Alimento. Los alimentos representan la fuente de exposición más importante para los individuos de la población general no ocupacionalmente expuestos. La cantidad de cadmio ingerida diariamente varía mucho. El promedio de ingesta diario es de 10 a 25 $\mu\text{g/día}$ en Europa y sobre 50 $\mu\text{g/día}$ en Japón. El hígado y riñón de adultos mamíferos contienen Cd en grandes cantidades. Se ha reportado que algunos mariscos como las ostras tienen alto contenido de Cd. El rango de ingesta diaria de Cd a través de la comida es de 10 a 400 μg , y la dosis recomendada por la FAO es de 70 $\mu\text{g/día}$ (Galvao, 1987).

Suelo. Si bien la exposición por este medio es de forma indirecta es importante considerarla aunque en general sea baja; puesto que hay regiones donde incrementa la concentración del metal en el suelo por el uso de fertilizantes y lluvia ácida. El arroz y el trigo pueden acumular altas cantidades de cadmio con dependencia estacional (Nordberg, 1988).

Tabaco. El cigarro contiene de 1 a 2 μg de Cd, el fumar 20 cigarros al día implica una ingesta de 2-4 μg . Parte de éste se elimina con la combustión, pero se inhala de 0.1 a 0.2 $\mu\text{g/cigarrillo}$, lo que puede causar acumulación de 12 mg de cadmio en el organismo al cabo de 20 años de haber fumado 20 cigarrillos diarios. El cadmio es un metal tóxico para el ser humano aún en concentraciones bajas (Galvao, 1987).

La exposición al cadmio en los humanos es generalmente mediante dos fuentes de contaminación, en la población no fumadora y ocupacionalmente no expuesta. La primera vía es la oral por agua e ingestión de alimentos, representando el 5 al 10% del total del cadmio absorbido por el cuerpo (Nordberg, 1988). Estas concentraciones dependen de la ingestión de proteínas y la presencia de vitamina D, incluso se relaciona con la concentración de algunos elementos en el organismo tales como Zn, Se y Ca con los cuales el cadmio compete. La segunda vía por la cual el ser humano está expuesto al cadmio es a través de la inhalación (Nordberg, 1988). La cantidad de cadmio inhalado depende de la concentración

del metal en el aire, de la retención de partículas en los pulmones, del componente químico inhalado, de las condiciones fisiológicas del sistema respiratorio y, en el caso de los fumadores la severidad del hábito. Por esta ruta del 15 al 20% del cadmio es absorbido hacia la sangre (Fortoul, 1984). Uno de los muchos efectos adversos al fumar tabaco es un incremento en la exposición de cadmio, y las concentraciones varían desde 1.56 a 1.96 por cigarro y 0.93 a 1.86 μg en puros; para estas concentraciones del 7 al 10 % corresponden principalmente al humo inhalado en los fumadores, y el 38 al 50 % restante corresponden al humo no inhalado de los fumadores. Alteraciones importantes tales como el asma, la otitis y el cáncer pulmonar se ha reportado en personas, en su mayoría niños que viven en contacto directo con fumadores. Los fumadores pueden absorber cantidades comparables a un consumo de 0.1 μg de cadmio por cigarro con 50% de absorción (Saldivar, 1990).

Modelo Metabólico (Farmacocinética)

Absorción, distribución y excreción.

La absorción de aerosoles de cadmio por el tracto respiratorio, depende del tamaño de la partícula y de la solubilidad del compuesto en sistemas in vivo, como se ve en la tabla 3.

Tabla 3.- Absorción después de la inhalación de compuestos de cadmio. Cálculo de absorción respiratoria y total, en función de dos rangos de absorción alveolar y diferentes tamaños de partículas.

Tamaño de la partícula (μm)	Depósito alveolar (%)	Depósito traqueobronquial y nasofaríngeo (%)	Porcentaje de Absorción en relación al porcentaje de absorción alveolar			
			respiratoria 100%	total 100%	respiratoria 50%	total 50%
0.2	28	3	28	28	14	14
0.6	20	2	20	20	10	10
2.0	35	46	35	37	18	20
4.0	24	74	24	28	12	16
6.0	10	89	10	14	5	9.5
10	0.2	99.8	.02	5.2	0.1	5.1

(Nordberg, 1988)

Estas características de las partículas determinan la concentración y la posibilidad de difusión del cadmio de los pulmones hacia el torrente sanguíneo. Después del depósito del cadmio en la cavidad nasofaríngea, la tráquea, los bronquios y los alveolos, parte de las partículas inhaladas ascienden por acción de los cilios, pasan al esófago y se absorben parcialmente en el tracto gastrointestinal (Nordberg, 1988). Las partículas restantes que llegan hasta los alveolos, son

absorbidas y pasan al torrente sanguíneo. La absorción tiene que ver con la solubilidad del compuesto inhalado; las variaciones fisiológicas y anatómicas de los individuos también influyen en éste proceso. Se estima que se absorbe del 10 al 40 % de las partículas inhaladas. Las partículas que no son absorbidas, digeridas o eliminadas en las secreciones van a constituir los depósitos de cadmio en el árbol respiratorio (Nordberg, 1988).

La ingesta vía respiratoria varía entre 0.1 a 35 % de la cantidad inhalada y la ingesta total considerando también la translocación del tracto gastrointestinal, es de 5.1 a 37 %. En humanos, del 25 al 50 % del Cd contenido en el cigarrillo es absorbido, la absorción puede ser tan alta como se ha indicado por determinaciones de los niveles de Cd en sangre de fumadores. Datos obtenidos en animales experimentales muestran que del 1 al 6 % de Cd es absorbido por una sola dosis oral, aunque depende de factores como la concentración y la dieta (Nordberg, 1988). Se ha reportado que la absorción en humanos varía entre 4.6 y 6 %, observándose que individuos con bajas reservas de hierro muestran una mejor absorción de Cd (4 veces), comparado con individuos que tienen una dieta normal. Cuando las cantidades ingeridas con los alimentos o el agua son elevadas, puede causar intoxicación a mediano o largo plazo (Nordberg, 1988). Prácticamente, nada se conoce sobre las formas químicas del cadmio presentes en los alimentos, lo que impide conocer los mecanismos de absorción intestinal (Galvao, 1987).

Distribución.

El cadmio absorbido es transportado en la sangre, tanto por proteínas plasmáticas como por eritrocitos, posteriormente se deposita en diversos órganos y tejidos, principalmente a riñón e hígado. En el organismo, 50% del cadmio absorbido se encuentra en éstos órganos (Nordberg, 1988). Una parte es retenida en la pared intestinal, dependiendo de la ruta de exposición y absorción. La deposición de cadmio en hígado y una menor cantidad en riñón induce la síntesis de una proteína de bajo peso molecular, la metalotioneína, la cual tiene la capacidad de unirse a metales. Por observaciones en roedores, mucho del cadmio en el hígado es ligado a la metalotioneína 8 horas después de su absorción. Con el tiempo éste cadmio es redistribuido por hígado, riñón y otros tejidos en forma de complejo enzima-metal, es decir, metalotioneína-cadmio. Este complejo es filtrado por el glomérulo y es reabsorbido en el túbulo proximal para ser depositado en el epitelio tubular (Nordberg, 1988). Subsecuentemente, el cadmio es liberado y vuelve a estimular la síntesis de metalotioneína renal, la cual es ligada al metal y retenida. De esta manera el cadmio se acumula en el cuerpo, principalmente en el riñón; con un tiempo de vida media que difiere dependiendo del tejido. Otros órganos que acumulan cadmio son los músculos y el páncreas, las glándulas salivales y en menor cantidad el sistema nervioso central (Clarkson, 1988). El cadmio atraviesa la barrera placentaria, pero en mucho menor grado que otro tipo de metales como el plomo y mercurio. La placenta hace también la función de depósito de cadmio, la cual al ser saturada por el metal permite el paso transplacentario (Sánchez, 1994).

Excreción.

La eliminación del cadmio acumulado en el organismo se hace principalmente a través de la orina y las heces, se estima alrededor del 0.01 al 0.10 % de la carga corporal total. La vida media del cadmio en el organismo es muy larga y se estima entre 10 y 30 años, período en el cual permanece almacenado en varios órganos (Clarkson, 1988).

La concentración media de cadmio en sangre entera está en el orden de 0.4 a 10 $\mu\text{g/L}$ en no fumadores y 1.4 a 45 $\mu\text{g/L}$ en fumadores. En general los niveles de cadmio en sangre son indicativos de una exposición reciente en términos de semanas o meses. Al nacer hay bajas cantidades de Cd en los tejidos, puesto que la placenta actúa como barrera (Clarkson, 1988). El cadmio en los tejidos aumenta progresivamente con la edad, la carga corporal total comienza en el orden de 10 a 30 mg para europeos, siendo mayor en japoneses. Aparentemente la mitad de la carga corporal está en riñón, y aproximadamente de un 15 a 29 % en hígado, habiendo una cantidad semejante en el músculo (Nordberg, 1988). Quienes tienen una exposición inhalatoria de larga duración a humo o vapores de cadmio, así como a polvo o cenizas de óxido de cadmio pueden padecer cambios enfisematosos en pulmón e incrementar la mortalidad por enfermedades de obstrucción crónica de vías respiratorias, categorizada como bronquitis crónica (Nordberg, 1988).

Interacción del cadmio con otras sustancias.

Las deficiencias de hierro, zinc, calcio y proteínas en el organismo facilitan una mayor absorción intestinal del cadmio (Carson, 1987, Clarkson, 1988).

En animales experimentales, se ha verificado que la administración simultánea de otros metales con cadmio tiene efectos preventivos de las lesiones causadas por éste. El zinc, el cobalto y el selenio han prevenido la necrosis tisular en ratones. El zinc ha demostrado un papel protector en los cuadros de hipertensión arterial en ratones (Galvao, 1987).

Efectos sobre la salud.

Las manifestaciones clínicas de intoxicación con este metal pueden ser agudas o crónicas, y generalmente de carácter sistémico. Las intoxicaciones que se pueden presentar en la población general, salvo situaciones accidentales o contaminaciones masivas, por ejemplo de alimentos, suelen en general ser de carácter crónico. En la población ocupacionalmente expuesta, es frecuente encontrar tanto intoxicaciones agudas como crónicas muy características. La clínica de las intoxicaciones por cadmio es variable, según la vía de penetración, la cantidad absorbida, el tiempo de exposición y las características propias del individuo expuesto (Nordberg, 1988).

Manifestaciones agudas a la inhalación.

La inhalación de altas cantidades de este metal puede determinar la aparición de síntomas no muy bien definidos al principio, pero luego se presenta fiebre, alteraciones digestivas, dolor torácico, disnea y edema agudo de pulmón, mismo que puede determinar la muerte por insuficiencia respiratoria. También puede aparecer anemia, albuminuria, hepatitis y anuria, todas estas pueden determinar la muerte por necrosis hepática (Galvao, 1987).

Manifestaciones crónicas a la inhalación.

La inhalación prolongada de cadmio por trabajadores expuestos puede determinar la aparición de un síndrome que incluye enfisema pulmonar y lesión de los túbulos renales con proteinuria. En estos casos se han observado también otros efectos como anemia, alteraciones hepáticas y cambios en el metabolismo de minerales (Carson, 1987).

Mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad.

Se han reportado resultados contradictorios en estudios tanto in vitro como in vivo en relación a la actividad mutagénica del cadmio (Nordberg, 1988). Se han descrito alteraciones cromosómicas en estudios experimentales y en personas expuestas por largos periodos a cadmio. Hay reportes tanto positivos como negativos, con respecto a la inducción de aberraciones cromosómicas en *Drosophila*, plantas y sistemas mamíferos. En cuanto al ensayo de mutaciones en *Salmonella* y *E. coli* los reportes son negativos. Hay resultados positivos obtenidos con el ensayo Rec en *B. subtilis*, en el cual se evalúa la capacidad reparativa de daño inducido al ADN por cloruro, sulfato y nitrato de cadmio (Nordberg, 1988). Se han encontrado rompimientos cromatídicos en células de hámster chino in vitro y en leucocitos humanos a dosis altas, aunque también hay resultados negativos en los mismos sistemas. A bajas dosis de cloruro de cadmio en células CHO se induce un efecto protector a una exposición a dosis mayores, esta posible resistencia fue atribuida a la síntesis de metalotioneína a exposiciones de baja concentración. Estudios in vivo tanto en animales como en humanos muestran resultados contradictorios, pero predominan los resultados negativos. Ratonos con dieta conteniendo cloruro de cadmio durante 1 mes, mostraron un incremento en la frecuencia de gaps, fragmentos e intercambios de cromátidas hermanas en células de médula ósea y se encontraron resultados negativos en cuanto a la inducción de micronúcleos (Nordberg, 1988). La inyección intraperitoneal de cloruro de cadmio no incrementó las mutaciones letales dominantes en ratones y disminuyó la inducción de translocaciones. Se encontró un aumento en las aneuploidias de oocitos de ratón y hámster tratados con cloruro de cadmio a dosis altas. El cloruro de cadmio está considerado como un débil inductor de intercambios de cromátidas hermanas. Anormalidades cromosómicas se observaron en pacientes japoneses con enfermedad de itai-itai. Por otro lado se reportaron resultados negativos en ratas a las que se les aplicó una suspensión intratraqueal de óxido de cadmio, las cuales fueron seguidas durante toda su vida

(Nordberg, 1988). Alta incidencia de cáncer pulmonar se reportó en ratas expuestas a aerosoles de cloruro de cadmio. Se ha atribuido al cadmio un incremento en la incidencia de cáncer de próstata y del aparato respiratorio en trabajadores expuestos crónicamente al metal en forma de óxido de cadmio principalmente (Galvao, 1987). Se ha demostrado una disminución en la fidelidad de la síntesis de DNA por efecto del acetato y cloruro de cadmio (Hartwig, 1994).

Via de exposición aérea.

Esta vía ha sido poco estudiada debido al difícil manejo experimental (determinación de concentraciones, la presencia de mezclas complejas, sinergismo y antagonismo entre contaminantes).

Sistema respiratorio.

Todos los animales superiores necesitan oxígeno para mantener sus procesos metabólicos. El sistema respiratorio sirve para captar el oxígeno del aire inspirado y para la eliminación del dióxido de carbono producido en el metabolismo celular del organismo. El oxígeno es llevado hacia las células y el dióxido de carbono es transportado de ellas por el sistema circulatorio a otros órganos. Puede imaginarse al sistema respiratorio constituido por una porción conductora proximal, que conecta con el exterior al cuerpo, y por una porción respiratoria distal donde tiene lugar el intercambio entre sangre y el aire (Fawcett, 1988). En mamíferos la porción conductora incluye las vías existentes en la nariz, la faringe, la laringe, tráquea y un sistema ramificado de bronquios de calibre cada vez más pequeño. Las ramas más pequeñas, los bronquiolos, se continúan con la porción respiratoria de los pulmones. Está formada por los bronquiolos respiratorios, los conductos alveolares y los alveolos, que juntos constituyen la mayor parte del volumen pulmonar (Fawcett, 1988). Los pulmones se encuentran bien protegidos dentro de la caja torácica, una estructura expandible semejante a una caja, cuyas paredes están formadas por las costillas, los cartilagos costales, el esternón y el diafragma en forma de cúpula forma el piso. Cada pulmón está invaginado en su propia cavidad pleural, la cual se reduce a un espacio virtual. Esta cavidad está revestida por una membrana serosa con epitelio escamoso simple, la cual aunada a su capa subserosa subyacente de tejido conectivo fibroelástico denso constituyen una capa de revestimiento conocida como la pleura (Fawcett, 1988). En el hilio del pulmón, el cual es el sitio donde entran o salen los vasos sanguíneos mayores, los conductos respiratorios, los linfáticos y los nervios, la pleura parietal que reviste las paredes de la cavidad se continúa con la pleura visceral que cubre el pulmón. La fricción entre las dos membranas serosas adosadas se reduce al mínimo durante los movimientos de la respiración mediante la presencia de una película delgada de líquido tisular en el estrecho espacio entre ellas. Durante la inspiración, la contracción del diafragma, acompañada de un movimiento expansivo de las costillas, aumenta la capacidad de la caja torácica lo suficiente como para introducir un nuevo aporte de aire hacia

los pulmones. Al mismo tiempo esta acción imprime tensión elástica creciente sobre la pleura visceral y dilata completamente el árbol traqueobronquial y los componentes finos del tejido respiratorio pulmonar, todos los cuales están provistos con abundante elastina. El retroceso pasivo subsecuente de esta elastina estirada es el factor principal para la expulsión del aire al regresar la caja torácica a sus dimensiones anteriores durante la espiración (Cormack, 1986). El aparato respiratorio esta formado por las siguientes porciones:

Porción Conductora. La cual está formada por la cavidad nasal (cornetes nasales, áreas olfatorias), nasofaringe (amígdala faríngea), laringe (epiglotis), tráquea, bronquios (extrapulmonares o primarios e intrapulmonares que son los secundarios y terciarios) y cubierta pulmonar.

Porción Respiratoria. Esta la constituyen los bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares, alveolos y pleura visceral.

La vía aérea conductora del aparato respiratorio es un sistema ramificado que comienza en la tráquea y continúa a lo largo de 16 generaciones de ramificaciones dicotómicas, para terminar en los bronquiolos terminales (Fawcett, 1988). Este patrón de ramificación redunda en una disminución progresiva del diámetro de los canales, y un aumento concomitante de su número y del área transversal total del sistema. Es habitual referirse a las ramas distales a la tráquea con los nombres de bronquios, bronquiolos terminales, pero habría que recordar que hay varias generaciones de ramificaciones dentro de las dos primeras categorías, de tal manera que a nivel de los bronquiolos terminales el número de ramas ha alcanzado la cifra de 65000, cada una con un diámetro de aproximadamente 0.2 mm (Fawcett, 1988). Los conductos de todo el árbol bronquial sirven simplemente para conducir el aire inspirado y espirado hacia y desde la porción respiratoria del pulmón, donde tiene lugar el intercambio gaseoso con la sangre (Fawcett, 1988).

Bronquiolos.

Los bronquiolos están revestidos por un epitelio simple en vez de pseudoestratificado. En los de mayor calibre, el epitelio es cilíndrico simple ciliado, en tanto que en los más finos, es epitelio cúbico simple no ciliado. Otras características que definen a los bronquiolos, son que no poseen cartilago ni glándulas en su pared (Barile, 1994). El epitelio de los bronquiolos no es tan grueso como el de los bronquios. En los bronquiolos de mayor calibre predominan las células cilíndricas no ciliadas llamadas de Clara (Ham, 1988). La población de células de Clara en el revestimiento epitelial de los bronquiolos, es uno de los tipos de células más heterogéneas y multifuncionales en el pulmón de los mamíferos. En cuanto a la población del epitelio bronquiolar esta constituido en un 65% por células ciliadas y un 35 % por no ciliadas. De estas últimas se han descrito algunas como células serosas, intermedias, en cepillo y la célula de Clara (Fortoul, 1984).

Células de Clara.

El revestimiento de las vías aéreas distales del pulmón están formadas por células ciliadas y no ciliadas. Las células de Clara son un ejemplo de células epiteliales no ciliadas, las cuales se identifican por tener capacidad secretora. La naturaleza de los productos secretores putativos y el mecanismo de secreción no ha sido completamente establecido (Barile, 1994). Estas células han sido reportadas por tener fosfolípidos, aunque son distinguibles de las células epiteliales tipo II, porque las células de Clara pierden su reactividad ante la tinción de Papanicolaou (Barile, 1994).

La célula de Clara fue descrita por primera vez en 1853 por Kölliker, en el bronquiolo de perro. En 1937, Max Clara realizó una descripción detallada de estas células, de ahí que lleven su nombre. La primera descripción ultraestructural de células de Clara en bronquiolo de ratón se hizo en 1956 por Karrer. A nivel ultraestructural se ha encontrado gran variabilidad entre especies de mamíferos. Las características morfológicas más notables de estas células se aprecia a nivel de microscopía de transmisión (Fortoul, 1984).

En la mayoría de las especies de mamífero la célula de Clara se caracteriza por prestar una proyección apical hacia la luz del bronquiolo. La célula de Clara se localiza en los bronquiolos terminales y se extiende desde la lámina basal hasta la luz del bronquiolo, es decir, en la porción proximal o central del acino pulmonar (Barile, 1994). Esta es la zona de transición entre las vías de conducción y el área del intercambio gaseoso. La composición del espacio peribronquiolar asociado con las células de Clara incluye la presencia de músculo liso adyacente a la lámina basal, colágena entremezclada con elastina y pocos capilares.

La célula de Clara se define como cuboidea o columnar, con pocas proyecciones apicales, libre de microvelosidades apicales largas con acúmulos de microfilamentos densos. Presenta gránulos ovoideos en la parte apical de la célula, estos gránulos están rodeados de una membrana electrodensa y gran cantidad de retículo endoplásmico liso. En relación a sus gránulos, se han detectado, dependiendo de la especie estudiada, diferentes componentes predominando lípidos y mucopolisacáridos (Charles, et al. 1991).

La presencia de fosfolípidos en la célula de Clara hizo postular a Niden en 1967 la posibilidad de que esta fuera la productora del surfactante y no el neumocito tipo II, este aspecto actualmente se encuentra totalmente aclarado, ya que es el neumocito tipo II el que lo produce. Body en 1974 detectó en la célula de Clara una alta concentración de las enzimas del grupo conocido como "oxidasas de función mixta" asociadas o dependientes del citocromo P-450. Este sistema enzimático se encarga de eliminar los compuestos no polares, aumentan la solubilidad en agua y proporciona grupos funcionales para conjugar esos compuestos con glucónidos o sulfatos, facilitando la eliminación de las mismas, estas enzimas se localizan en la fracción microsomal de la célula (Barile, 1994).

Estudios realizados con esta célula han demostrado que puede ser la precursora directa de la célula ciliada ante agresiones como inhalación de NO₂, inyección de

polonio, inhalación de ozono y tratamiento con uretano. En el cuadro 2 se listan las funciones de la célula de Clara.

Cuadro 2. Funciones atribuidas a la célula de Clara.

Funciones de la célula de Clara
• Productora del material que cubre a los cilios del epitelio bronquiolar
• Sitio de metabolismo de productos o agentes xenobióticos
• Reguladora del metabolismo del surfactante
• Reparadora del epitelio bronquiolar al dar origen a la célula ciliada

Fortoul, 1984.

La célula de Clara tiene su núcleo en la zona media, el cual es alargado y bilobulado hacia la base de la célula. La zona apical de la célula de Clara se caracteriza por contener gran cantidad de retículo endoplásmico liso, el cual consiste de vesículas y largos tubulos comunmente ramificados. El espacio cubierto por las membranas del retículo endoplásmico liso contienen un material amorfo poco denso y por otro lado el retículo endoplásmico rugoso es abundante en la zona media, frecuentemente se encuentra rodeando a la mitocondria dándole la apariencia de contener gran cantidad de capas (Smith, 1974). La mitocondria en la zona apical es típicamente esférica, la matriz mitocondrial es electrodensa con bordes alargados, curvos y ramificados (Young, 1986).

La célula de Clara posee gránulos que con base en su forma y electrodensidad se dividen en tres tipos, como se señala en el cuadro 3.

Cuadro 3. Definiciones de los gránulos de la célula de Clara.

GRANULO	DEFINICION
Obscuro	Gránulo electrodense comúnmente ovoide cuyo diámetro aproximado es de 0.5 μm .
Claro	Gránulo alargado, electrolúcido con su centro electrodense y con un diámetro aproximado de 0.8 μm .
Alargado	Gránulo electrodense con forma aplanada (no presente en todas las células) con un diámetro aproximado de 0.2 a 1 μm .

Stephen et al, 1986.

Por todas las características ultraestructurales antes mencionadas, se ha sugerido una alta actividad metabólica en ellas. Se han detectado altos niveles de citocromo P450 isozima monooxigenasa en estudios inmunohistológicos y preparaciones autoradiográficas. Con respecto a que estas células respondan metabólicamente al efecto de diversos químicos, puede estar relacionado a la presencia de enzimas que metabolizan xenobióticos. Las células de Clara y los neumocitos tipo II han mostrado tener un papel importante en la detoxificación de xenobióticos, como un resultado de su capacidad enzimática. Devereux en 1981 demostró que la toxina pulmonar 4-ipomeanol, es activada por la célula de Clara y células alveolares tipo II (Barile 1994).

Biomarcadores.

El conocer, detectar e identificar todos aquellos cambios biológicos tempranos que son generados por la exposición a alguna(s) sustancia(s) xenobiótica(s), son puntos indispensables para la prevención y el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica desde un punto de vista celular (Gonsebatt, 1994). Si la exposición a sustancias tóxicas produce cambios o alteraciones tempranas o iniciales en los individuos, antes del desarrollo del impedimento o la enfermedad, estos cambios podrían convertirse en señales o " marcadores", los que pueden ser evaluados mediante estrategias adecuadas, y correlacionarse con los efectos observados a largo plazo en modelos experimentales o en grupos humanos expuestos (NRC, 1989). La magnitud de la alteración que produce la exposición a sustancias tóxicas dependerá de la naturaleza del compuesto, de la dosis y la vía de exposición así como de la función que desempeñe en el organismo el (los) tejido (s) afectado (s) (NCR, 1989; 1992 ; Klaasen y Eaton, 1991). Se llaman indicadores o marcadores biológicos a aquellos elementos relacionados con la actividad de los seres vivos, que permiten determinar eventos relacionados con su fisiología de manera cuali o cuantitativa. Los biomarcadores se pueden clasificar en: biomarcadores de exposición, de susceptibilidad y de efecto. Los de exposición son aquellos que miden la concentración de agentes químicos o de sus metabolitos en los fluidos biológicos, o en los tejidos; los de susceptibilidad son indicadores de una limitación heredada o adquirida de la capacidad de un organismo para responder al reto de la exposición a un agente xenobiótico específico. Finalmente, los marcadores o indicadores biológicos de efecto son las alteraciones bioquímicas, fisiológicas, genéticas o de otro tipo que, dependiendo de su magnitud, pueden ser reconocidas como un daño potencial o efectivo sobre la salud y son producto de la exposición a un agente determinado (NCR, 1989).

Para la investigación en salud ambiental, los marcadores biológicos de efecto a un agente tóxico son considerados en el contexto de su relación con la salud del individuo (NRC, 1989; 1992), por lo que un efecto se define como: una alteración en un tejido u órgano, un evento temprano en un proceso biológico predictivo del desarrollo de un padecimiento, un padecimiento o una enfermedad clínicamente identificable, una respuesta periférica o paralela al desarrollo de una enfermedad, pero para predecir la evolución de un padecimiento (Gonsebatt, 1994).

Los marcadores de efectos biológicos tempranos incluyen alteraciones en las funciones de los tejidos blanco después de la exposición. Como señales de alarma, estos marcadores pueden ser dosímetros para guiar la intervención en cuanto a reducir o prevenir la exposición. Estas señales tempranas pueden también observarse en órganos o tejidos diferentes de los sitios que son críticos para la acción de la sustancia tóxica (NRC, 1989). Un tejido afectado por una sustancia tóxica puede exhibir una función alterada aún si el individuo afectado no presenta manifestaciones de ello. Estas funciones alteradas pueden en algunos casos determinarse en pruebas, particularmente con métodos bioquímicos o

biológicos (NRC, 1989; Ostrosky et al, 1991; Gonsebatt et al, 1992; Burns y Munson, 1993).

Varias pruebas han sido propuestas como marcadores de efecto genotóxico, por ejemplo, las aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas, micronúcleos, la síntesis de ADN no programada, las mutaciones génicas y más recientemente se ha propuesto al ensayo cometa o electroforesis unicelular, como un método muy sensible para detectar la presencia de daño en el ADN por agentes xenobióticos (Singh et al, 1988 y Tice et al 1991).

Electroforesis unicelular o ensayo cometa.

Los ensayos o pruebas de genotoxicidad, se han clasificado según las características de los eventos que pueden detectar, de tal forma que hay cuatro grupos: el que detecta mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, daño al ADN y transformación morfológica, tal como se ve en el siguiente cuadro (Brusick, 1987).

Cuadro 4.- Clasificación de ensayos de corta duración.

Grupo	Características de los eventos detectables
Mutación génica	Cambio de nucleótidos por conducto de sustitución o adición/delección.
Aberraciones cromosómicas	Cambios estructurales y/o numéricos en cariotipos normales.
Daño al ADN	Interacciones del ADN con grupos heterogéneos, incluyendo aductos en ADN, rompimientos sencillos, estimulación de la reparación del ADN, ICH (intercambio de cromátidas hermanas).
Transformación morfológica	Cambios morfológicos en células blanco asociadas con tumorigenicidad.

Tomado de Brusick, 1987.

A su vez, las pruebas que detectan daño al ADN se dividen en dos categorías una de ellas es la de las macrolesiones, en esta, el daño al ADN tiene efectos detectables a través de análisis citológico o cromosómico. La otra categoría es la de las microlesiones, en esta, los cambios ocurridos en el ADN pueden ser adiciones, deleciones o sustituciones a nivel de nucleótidos (Brusick, 1987).

En los últimos años se ha propuesto una técnica que cuantifica el daño en el ADN de células individuales, a la cual se le conoce como "Ensayo Cometa" o bien, electroforesis de células individuales (Singh et al 1988).

Las técnicas que permiten detectar daño en el ADN, tienen gran utilidad en estudios de toxicología ambiental, carcinogénesis y envejecimiento celular. Estas técnicas generalmente detectan el daño en tejidos y tipos celulares específicos. Sin embargo, el ensayo cometa tiene la ventaja de poder aplicarse a cualquier tejido, células aisladas y cultivos, pudiendo ser las muestras frescas ó congeladas, además, la evaluación del daño se hace en células individuales (Singh et al 1988). Otra ventaja de la técnica es que se requiere de un volúmen de muestra muy pequeño debido a que basta con tener de 10,000 a 50,000 células por laminilla, es decir, si se utiliza sangre entera es suficiente con 5 o 10 μ l de muestra. Por otro lado, a diferencia de otras técnicas como la elución alcalina, el ensayo cometa se realiza en poco tiempo (5 horas aproximadamente), y en general su costo es mucho más bajo (McKelvey-Martin et al 1993). El ensayo cometa o SCGE (single cell gel electrophoresis) al ser un sistema potencialmente sensible para medir la inducción de daño genotóxico ha sido utilizado tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, para detectar daño en el ADN y reparación inducidos por varios agentes en una gran variedad de células de mamífero (Tabla 4), así mismo puede aplicarse a cultivo de células, cultivo de tejidos, o bien, en cultivos de células primarias en suspensión. Su particular atributo, es que tiene un amplio campo de aplicaciones en estudios de daño al ADN, reparación, biomonitorio, análisis de productos biotecnológicos, etc., (McKelvey-Martin et al 1993).

El ensayo cometa presenta ciertas ventajas: a) Es posible investigar la extensión del ADN roto en virtud del tejido del animal experimental ó de los especímenes de biopsias en humanos, puesto que se necesita de una pequeña cantidad de células ($< 2 \times 10^5$). En comparación con la elución alcalina, que requiere de $2 - 5 \times 10^6$ células por filtro. b) El procedimiento puede llevarse a cabo en pocas horas y si se cuenta con un analizador de imágenes los resultados se pueden evaluar inmediatamente. c) Los resultados indican que el SCGE es igualmente sensible que el ensayo de elución alcalina (McKelvey-Martin et al 1993). Con respecto a la sensibilidad que tiene la técnica de SCGE, esta es capaz de detectar desde 0.1 rompimientos de ADN por cada 10^9 daltones, lo cual significa que puede detectar desde un sitio álcali lábil, hasta rompimientos de ADN de doble cadena; pero además, la detección del daño es a nivel de células individuales, lo cual permite evaluar el nivel del daño en subpoblaciones celulares a nivel individual.

El ensayo cometa se ha aplicado en el monitoreo de poblaciones susceptibles a daño oxidativo, radiación ionizante y U.V., utilizando muestras de linfocitos humanos, así como en el biomonitorio de trabajadores expuestos a sustancias

peligrosas. Sin embargo el monitoreo a través del ensayo cometa no sólo se limita a poblaciones humanas, por ejemplo se ha empleado en el monitoreo de peces y gusanos de tierra expuestos a contaminación ambiental. La capacidad de detectar daño en células individuales, hace posible identificar subpoblaciones resistentes o sensibles a un determinado agente. Otra ventaja del ensayo en el monitoreo, es que permite analizar un número de células estadísticamente adecuado. La detección de subpoblaciones de células con ADN dañado con drogas o radiación depende mínimamente de la heterogeneidad en el daño detectado en poblaciones de células homogéneas. La heterogeneidad del daño al ADN en las poblaciones es bastante pequeño (coeficiente de variación menor al 20 %) cuando las condiciones de lisis y electroforesis son óptimas (McKelvey-Martin et al 1993).

Una contribución importante de la técnica, en el campo de la toxicología es la posibilidad de aplicarla en estudios in vivo, puesto que se requiere de un pequeño número de células y puede emplearse en prácticamente cualquier órgano o tejido, incluyendo sangre, médula, cerebro, mucosa gastrointestinal, riñón, hígado, pulmón, mucosa nasal, ovarios, piel, bazo y testículo, tal como se puede ver en la tabla 4 (Tice, 1995).

Tabla 4. Agentes evaluados mediante el ensayo cometa, en estudios in vivo.

Agente	Tejido														Referencia
	vejiga	sangre	medula	cerebro	tracto gi.	riñón	hígado	pulmon	e. nasal	ovario	piel	bazo	testicul		
acrilamida		+	-	+			+	+		+	+	-	+	Tice et al 1990, 1991 Croome et al 1991 Fried et al 1993	
benceno		+	-				+							Plappert et al 1994	
clorometilpireno					+									Kennelly et al 1993	
dimetil nitrosamina		+								+				Croome et al 1991	
etilmetano sulfonato		+								+				Croome et al 1991	
ceniza	-CD +CS	+CD +CS					-CD +CS	-CD +CS				-CD +CS		Andrews et al 1994	
lindano					+				+					Pool-Zobel et al 1993	
cloruro de metilmercurio		-												Betti et al 1993	
metilnitroso guanidina					+									Betti et al 1993 Pool-Zobel et al 1993	
nitrosodimetil amina		+							+					Pool-Zobel et al 1993	
metilnitroso aminobutanolona		-							+					Pool-Zobel et al 1992	
arsenito de sodio	-CD +CS	-CD +CS					-CD +CS	-CD +CS				-CD +CS		Tice et al 1994 Yager et al 1994	
sitropozotacina					+		+							Schmeizer et al 1994	
tolueno		-	-				-							Plappert et al 1994	

+ respuesta significativa, - respuesta no significativa, tracto gi. tracto gastrointestinal, e. nasal epitelio nasal, CD dieta deficiente en colina, CS dieta proficiente en colina.
Tomado de Tice, et al 1995

Se han hecho estudios para determinar si la edad es un factor que influye en el daño basal de hepatocitos de rata, así como la inducción y la persistencia del daño inducido en células germinales de roedores tratadas con químicos. Las diferencias en la magnitud del daño en el ADN inducido en tejidos específicos es un indicador importante de la distribución y cantidad de células dañadas, lo cual provee información relativa a la heterogeneidad de la respuesta en el órgano o tejido de interés (Tice, 1995).

JUSTIFICACION

Si bien, no se ha precisado la correlación entre la concentración de Pb y Cd en el aire y un efecto específico; en el caso particular de la entrada al organismo de estos metales por inhalación (vía poco estudiada) es muy importante poder definir los efectos en la morfología y fisiología de las células, a largo plazo tales como procesos alérgicos, enfisema pulmonar, bronquitis, fibrosis pulmonar y cáncer (Fortoul, 1996). En un estudio en fase inicial, es indispensable el uso de modelos experimentales para tener un buen control de las variables y poder identificar adecuadamente la relación dosis-respuesta (Brusick, 1987; Fishbein, 1987). Mientras no se definan los efectos reales de los contaminantes presentes en nuestro ambiente, no es posible hablar de patologías producto de la contaminación (Fortoul, 1996).

Con la finalidad de identificar biomarcadores de exposición a Pb y Cd en un modelo experimental vía inhalación se evaluarán los efectos genotóxicos, mediante la técnica de electroforesis unicelular en diferentes órganos (Células nasales, pulmón, riñón, hígado, cerebro, médula ósea, sangre y testículo). La identificación de alteraciones con este sistema daría un sustento para entender los posibles mecanismos de genotoxicidad metálica por inhalación, vía que como ya se mencionó ha sido poco estudiada y resulta ser una de las principales vías de acceso a xenobióticos a nivel individual y por tanto a nivel de poblaciones expuestas.

HIPOTESIS:

La inhalación de Pb y Cd y su mezcla inducirá daño genotóxico tanto en el órgano con el que tienen el primer contacto (células nasales y pulmón), así como en otros órganos a los que pueda(n) distribuirse posteriormente.

OBJETIVO GENERAL:

Conocer la magnitud del daño genotóxico producido por la inhalación de Pb, Cd y por la interacción de ambos, así como identificar los mecanismos de acción individuales y/o combinados (sinergismo).

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Cuantificar el daño al ADN, tanto en el órgano de exposición inicial -células nasales y pulmón -, así como en sangre el cual es un tejido que se distribuye a través del organismo, también en órganos filtro, tales como: riñón, hígado; en un órgano en el que se ha observado acumulación de metales pesados -cerebro-, en médula ósea (tejido en continua proliferación), así como evaluar el posible daño reprotóxico en testículo mediante la técnica de electroforesis unicelular.
- Evaluar el posible efecto sinérgico entre el plomo y el cadmio en la producción de daño al ADN.

MATERIAL Y METODOS.

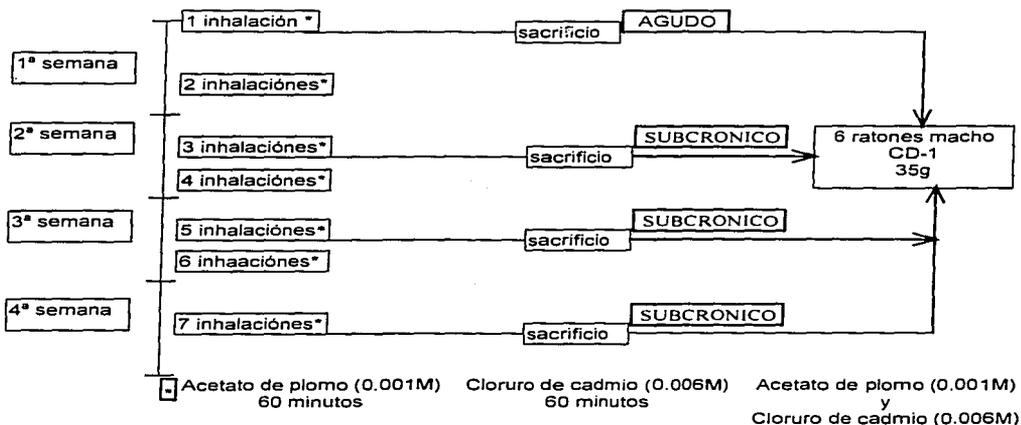
Animales

Se utilizaron 24 ratones adultos macho CD-1 de 35 g, los cuales se sometieron a la inhalación de cloruro de cadmio y/o acetato de plomo por 60 minutos, 2 veces por semana durante 4 semanas. Los animales inhalan una concentración de cloruro de cadmio 0.006 M, y/o 0.001 M de acetato de plomo. Un grupo de 8 ratones sirvieron como controles, inhalando únicamente el vehículo que se empleó para hacer la solución (agua bidestilada y desionizada).

La inhalación se realizó en una caja de acrílico transparente de 31.47 cm³ a la que se conectará un ultranebulizador (Ultra Neb 99 DeVilbiss), con un flujo de 10 l/min. En la conexión del ultranebulizador y la cámara de inhalación se colocará un filtro durante la exposición, posteriormente se retirará y se determinará en él la concentración del metal mediante espectrofotometría de absorción atómica. Después de cada inhalación los animales se colocaron en sus respectivas cajas, dándoles libre acceso al agua y alimento.

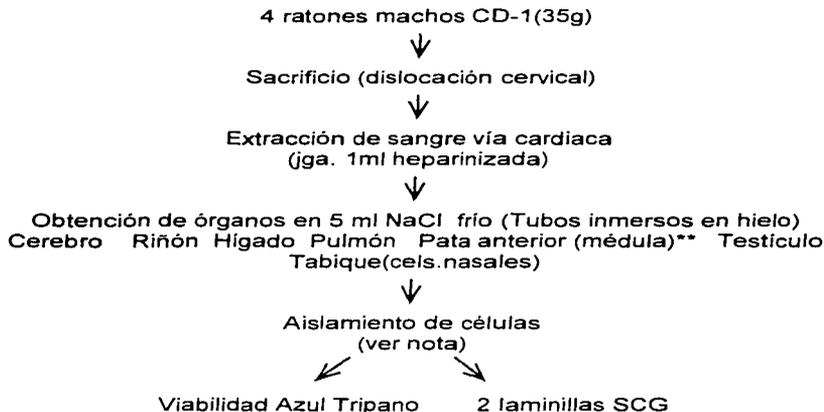
Semanalmente se sacrificaron 6 ratones de los cuales un control y un expuesto se utilizaron para el análisis de ultraestructura de las células de Clara y para determinar la concentración de los metales en los diferentes órganos. Los restantes cuatro animales se emplearon para determinar la genotoxicidad, uno de ellos fue el control y los demás fueron expuestos, de acuerdo al esquema.

ESQUEMA DE INHALACIONES PARA CADA TRATAMIENTO (Pb, Cd y Pb-Cd).



Para la obtención de las suspensiones celulares empleadas en la evaluación de genotoxicidad se empleó el siguiente diseño experimental.

Diseño experimental a seguir en todos los ensayos.



Nota: Poner el órgano en 5ml de NaCl frío. Hacer 2 lavados con la misma solución y pasarlos a 5 ml de medio RPMI-1640 frío, seccionar el órgano en dos porciones y hacer 2 lavados con RPMI-1640. Cortar en piezas finas con tijeras frías, resuspender con pipeta de 5 ml, esperar a que sedimente y remover 30 µl de la suspensión celular, mezclar con 75 µl de LMP.** Perfundir el fémur con 1 ml de NaCl frío, coleccionar en eppendorf y mezclar 30 µl de esta suspensión con la agarosa LMP.

Evaluación del efecto genotóxico mediante Electroforesis Unicelular.

Esta técnica que evalúa el daño sobre el ADN de células individuales, esta basada en técnicas electroforéticas descritas por Ostling y Johanson en 1984 y modificada por Singh et al en 1988. Brevemente la técnica consiste en lo siguiente:

Las células obtenidas en éste caso particular por maceración de órganos, son embebidas en agarosa sobre un portaobjetos (entre 2 capas de agarosa). Posteriormente se colocan en una solución de lisis por lo menos una hora en dicha solución se romperan tanto las membranas celulares como las nucleares. Enseguida se ponen en el amortiguador de electroforesis y se dejan un tiempo para que el ADN se desenrolle, posteriormente son sujetas a un campo eléctrico (electroforesis), al cabo del cual se realiza una neutralización y son teñidas con un fluorocromo que se une al ADN (en este caso bromuro de etidio). El ADN roto migra mayor distancia bajo el efecto del campo eléctrico, de esta manera la imagen que se observa de las células asemeja a un cometa con una cabeza altamente fluorescente y una cola, la cual aumenta con la magnitud del daño. De esta forma, el parámetro a evaluar es la longitud de la migración de los fragmentos de ADN de una cadena roto, dicho de otra forma, el tamaño de la cola del cometa. Esto se evalúa con la ayuda de un ocular graduado adaptado a un microscopio de fluorescencia Olympus BX60, con un filtro de 240 nm, empleando un aumento de 20X.

Viabilidad.

La viabilidad se determinó mediante la tinción por exclusión de azul tripano. Para ello, se tomaron 20 µl de la suspensión celular obtenida y se mezclaron con 900 µl de medio RPMI-1640 y 100 µl de azul tripano. Posteriormente se observaron las muestras en un microscopio de luz. Olympus BX60 a un aumento de 10X. al microscopio.

Procesamiento para evaluación morfológica.

Los sacrificios de los animales se realizaron previa anestesia con pentobarbital sódico intraperitoneal, y se perfundirán por vía intracardiaca lavando con solución isotónica de NaCl y fijando con Karnovsky. Posteriormente se seccionaron los órganos y se colocaron en inmersión de glutaraldehído al 2 %. Una vez instilado el pulmón con fijador de glutaraldehído, se separó la parte media del pulmón izquierdo, se seccionó en tres porciones y se fijaron durante tres horas. Posteriormente se postfijaron, en tetróxido de osmio al 1% durante dos horas y se prosiguió a la deshidratación gradual con alcoholes del 20 hasta el 100%. La muestra de tejido se desecó a punto crítico en un desecador Samdry-780A por cinco minutos utilizando CO₂. Los fragmentos de tejido se colocaron en plataformas de aluminio, evaporados con carbón durante dos minutos se ionizaron con oro por seis minutos, utilizando un ionizador JEOL. Por último se observó en

un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM-950 y se fotografiaron las muestras a un voltaje de 25 kv y un aumento de 2000X.

Método Estadístico.

Para determinar las diferencias estadísticas del efecto genotóxico en los órganos muestreados (Células nasales, pulmón, riñón, hígado, médula ósea, sangre, testículo y cerebro) se empleó una "t" de Student ($p < 0.05$) (Zar, 1989).

RESULTADOS

Viabilidad

Una vez obtenidas las suspensiones celulares, se evaluó la viabilidad, los datos correspondientes a éste parámetro no se muestran, puesto que en cada uno de los ensayos y para todos los órganos se obtuvieron valores superiores al 80%, lo cual significa que se trabajó con dosis que no reflejaron citotoxicidad.

Determinación de metales

Las concentraciones de plomo y/o cadmio en los filtros de la cámara de inhalación fueron determinados por espectrofotometría de absorción atómica y el resultado de expresa en μg , tal como se muestra en la Tabla 5. Las determinaciones de metales hechas a los filtros controles no se incluyen en la tabla debido a que las cantidades no fueron detectables.

Tabla 5.- Concentración de plomo y/o cadmio en los filtros que conectan el ultranebulizador y la caja de exposición.

Semana de Exposición	Plomo (μg)	Cadmio (μg)	Plomo (μg) y Cadmio (μg)	
1	3.0	53	1.0	6.5
2	4.4	60	1.4	9.0
3	5.0	47	2.0	8.2

Así mismo, se determinó la concentración de éstos metales en los órganos de mayor importancia para evaluar algún efecto toxicológico. El pulmón debido a que la exposición fué a través de la vía inhalatoria y en los órganos filtro involucrados en la excreción tales como el hígado y el riñón, estos resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6.- Concentración de plomo y/o cadmio en pulmón, hígado y riñón de ratón CD-1 determinadas en las diferentes semanas de exposición.

PLOMO

Semana de exposición	Pulmón (µg/g)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)
1a	2.4	-	-
2a	0.3	0.3	2.7
3a	0.5	0.5	0.7
4a	0.4	0.5	2.0
Control	ND	ND	ND

CADMIO

Semana de exposición	Pulmón (µg/g)	Hígado (µg/g)	Riñón (µg/g)
1a	2.7	1.2	1.3
2a	5.1	3.0	1.7
3a	9.4	0.6	3.6
4a	4.4	3.5	0.4
Control	0.007	0.007	0.05

PLOMO Y CADMIO

Semana de exposición	Pulmón (µg/g)		Hígado (µg/g)		Riñón (µg/g)	
	Pb	Cd	Pb	Cd	Pb	Cd
1a	ND	3.0	0.16	1.3	0.62	0.53
2a	0.06	3.1	0.12	1.7	0.95	1.7
3a	0.26	4.4	ND	1.3	0.45	1.7
4a	0.09	4.5	0.24	1.6	0.42	2.9
Control	0.17	0.006	ND	0.02	ND	0.04

ND No detectado, - No determinado.

Genotoxicidad

El daño genotóxico evaluado a manera de rompimientos de una cadena de ADN mediante el ensayo cometa o electroforesis unicelular se presenta en las gráficas 1,2,3 y 4. En ellas se muestra el comportamiento seguido por los diferentes órganos durante todo el esquema de inhalaciones, donde es posible observar que durante la exposición a plomo los órganos afectados (pulmón, hígado, riñón, sangre y cerebro) muestran daño después de la primera semana de tratamiento y en menor magnitud que el causado por la inhalación de cadmio, donde los ocho órganos estudiados mostraron daño a lo largo de las cuatro semanas de seguimiento. Con respecto al tratamiento conjunto hay órganos donde el efecto sinérgico es muy claro, como es el caso del riñón, hígado, médula ósea y leucocitos.

Los datos se analizaron separando en tratamiento agudo (1 inhalación) y subcrónicos (3 a 7 inhalaciones). Los resultados obtenidos de la inhalación aguda se muestran en la gráfica 5, en donde se puede apreciar que el metal que tiene menor efecto genotóxico es el plomo en comparación con el cadmio, por otro lado se aprecia un claro efecto sinérgico por la exposición conjunta de plomo y cadmio, así mismo hay que notar que el órgano blanco por efecto de una exposición aguda a los diferentes metales y su mezcla es diferente. En la gráfica 6 se hace un análisis de la inducción de daño por efecto del tratamiento agudo con respecto al control en los diferentes órganos de ratón, en ella se aprecia que hay un efecto sinérgico en el riñón, así como también se observa que el órgano con más daño ocasionado por la exposición aguda a plomo es el pulmón, mientras que para el cadmio es la médula.

Los resultados de genotoxicidad por el tratamiento después de la primera semana de exposición (subcrónico), se muestran en las gráficas 1,2,3 y 4, el resumen de estos datos se muestra en la gráfica 7, la cual muestra la inducción de daño con respecto al control en los diferentes órganos pudiéndose ver que el órgano con mayor daño por el tratamiento subcrónico de plomo es el cerebro, mientras que para el cadmio los leucocitos son los que presentan más genotoxicidad; en cuanto al tratamiento conjunto el órgano más afectado fue el hígado.

A manera de resumen en la gráfica 8 se muestra el porcentaje de la inducción de daño con respecto al control en los diferentes órganos a lo largo de las cuatro semanas de exposición, en donde es importante hacer notar que el efecto por los tratamientos de los metales, plomo y cadmio por separado tienen mayor daño en las últimas semanas de exposición, mientras que en el tratamiento conjunto, el mayor daño se presenta en las primeras semanas de exposición.

Haciendo una descripción del daño inducido en cada órgano, se puede observar que la magnitud del daño varía en cada uno de ellos.

Riñón

El efecto del acetato de plomo sobre el riñón es alcanzado desde la primera inhalación, permaneciendo constante durante las siguientes dos semanas, puesto que en la cuarta se observa una mayor inducción de daño genotóxico. El cloruro de cadmio mostró mayor efecto en éste órgano si bien, no hay efecto significativo en la primera semana, si hay una marcada respuesta a partir de la segunda, hasta la cuarta semana de tratamiento, observándose claramente una dosis respuesta. El efecto de la inhalación conjunta de los metales en el riñón produjo mayor daño genotóxico en la primera semana de tratamiento, el cual se mantuvo igual hasta la tercera semana, mostrando una ligera disminución en la cuarta semana. En todos los casos se aprecian diferencias estadísticamente significativas. Los datos descritos anteriormente se ejemplifican en la gráfica 1.

Hígado

En este órgano se observa que a partir de la primera inhalación de acetato de plomo se induce un daño genotóxico significativo que permanece constante hasta la cuarta semana; con respecto a la inhalación de cloruro de cadmio se observa que una vez inducido el daño con la primera inhalación el efecto tiende a aumentar con los tratamientos, de tal forma que en la cuarta semana se observa un incremento considerable con respecto a las semanas anteriores. Por otro lado se observa que en este órgano, el efecto de la inhalación conjunta de los metales induce un mayor daño que el producido por los metales de forma individual en la primera inhalación, aunque en las inhalaciones posteriores disminuye sin perder la significancia estadística.

Cerebro

En el cerebro, el acetato de plomo indujo daño genotóxico de manera dosis respuesta durante las dos primeras semanas de tratamiento, en la tercera hay una disminución en el daño, incrementándose hacia la última semana, donde el efecto tuvo significancia estadística. En cambio, el cloruro de cadmio indujo daño de manera notoria desde la primera inhalación, y se mantuvo constante durante todo el seguimiento. Así mismo, el efecto observado por el tratamiento con ambos metales es similar al mostrado únicamente con el cadmio, aunque en el caso del tratamiento conjunto, la significancia estadística tuvo un valor menor de "p", debido a que las desviaciones estándar fueron menores.

Médula Osea

Con respecto a la médula ósea, se puede decir que el acetato de plomo no indujo daño genotóxico significativo en ninguna de las semanas de exposición, pero es importante destacar que éstos datos muestran una amplia variabilidad reflejada en las desviaciones estándar. En éste órgano, el cloruro de cadmio indujo un considerable daño genotóxico a partir de la primera semana de inhalación y se mantuvo constante hasta la cuarta semana, en este caso la significancia estadística tuvo una $p < 0.001$ y $p < 0.0001$. El tratamiento conjunto también produjo un efecto considerable desde la primera inhalación permaneciendo igual hasta la segunda inhalación, disminuyendo durante el tercer tratamiento y permaneciendo constante hasta la última, aunque en ningún caso se perdió la significancia estadística. Los datos referentes al cerebro y médula ósea se muestran en la gráfica 2.

Epitelio Nasal

En las células nasales, no se apreció daño genotóxico inducido por la inhalación de acetato de plomo después de cuatro semanas de tratamiento, sin embargo, el cloruro de cadmio sí indujo daño genotóxico significativo desde la primera semana de tratamiento, mismo que se mantuvo hasta la cuarta semana, si bien, en esta última semana no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas, fue debido a una gran variabilidad en la respuesta, lo cual se explica con los altos valores en la desviación estándar. La inhalación conjunta, mostró un significativo efecto en la primera, segunda y cuarta semana de exposición, sin haberse apreciado un resultado estadísticamente significativo en la tercera semana, debido quizá a la gran heterogeneidad de la respuesta mostrada por éstas células.

Testículo

En el testículo, al igual que en las células nasales, el acetato de plomo no fue capaz de inducir rompimientos de una cadena de ADN en ninguna de las cuatro semanas de exposición; sin embargo, el cloruro de cadmio y el tratamiento con ambos metales sí mostró una ligera dosis respuesta, la cual tuvo una buena significancia estadística ($p < 0.0001$), debido a que los datos fueron muy homogéneos. En la gráfica 3 se observan los datos correspondientes a las células nasales y al testículo.

Leucocitos

El efecto causado por la inhalación de acetato de plomo en leucocitos, mostró gran variabilidad en todas las semanas de tratamiento, lo cual dio como resultado el que únicamente en la segunda semana se apreciaron diferencias estadísticas significativas. En cambio, el daño inducido por el cloruro de cadmio se aprecia claramente como una dosis respuesta, donde en todos los casos la significancia estadística es de una $p < 0.0001$. En este tejido, el tratamiento conjunto indujo daño genotóxico importante desde la primera inhalación, que si bien, en este punto la respuesta mostró heterogeneidad, esta se redujo después de las siguientes inhalaciones. En la segunda semana se aprecia el mayor daño, en la tercera y cuarta semana tiende a disminuir el efecto, sin perder fuerza estadística (ver gráfica 4).

Genotoxicidad y alteraciones ultraestructurales

Pulmón

Los datos obtenidos de la genotoxicidad producida por el acetato de plomo y el cloruro de cadmio en pulmón, por correlacionar con las alteraciones en la ultraestructura de la célula de Clara o bronquiolar no ciliada se presentan simultáneamente. De primera instancia, en la fotografía 1 se muestra la ultraestructura normal, donde es posible observar el aspecto de las células de Clara correspondientes a un control.

Acetato de Plomo

Con respecto al daño inducido por una inhalación de acetato de plomo, se aprecia que hubo daño genotóxico significativo (ver gráfica 4), el cual correlaciona con las alteraciones ultraestructurales del bronquiolo mostradas en la fotografía 2, donde se puede ver la disminución en número de las células de Clara, por lo cual es posible observar células ciliadas que en el bronquiolo control no se pueden apreciar; para la segunda semana de tratamiento, no se observa daño genotóxico, aunque hay una gran variabilidad en la respuesta. Los cambios ultraestructurales en éste caso reflejan lo mismo, puesto que hay una recuperación en número de las células de Clara, puesto que éstas predominan sobre las células ciliadas; por otro lado, la variabilidad detectada en cuanto a la genotoxicidad también se aprecia en la ultraestructura del bronquiolo, puesto que se observan células de Clara con morfología cilíndrica normal, las cuales tienen actividad secretora, también es posible ver células que sugieren mitosis y células muertas (fotografía 3). Con respecto al efecto causado después de cinco inhalaciones, nuevamente se observa un incremento en la genotoxicidad causada por el plomo, la cual es estadísticamente significativa, lo cual correlaciona con las alteraciones presentadas en bronquiolo (fotografía 4), donde es posible observar que las células ciliadas vuelven a predominar sobre las de Clara, las cuales se encuentran en diferentes condiciones, la mayoría de aspecto normal, pero también se observa hiperplasia en las células ciliadas. En cuanto a las células ciliadas, es importante mencionar que hay un acortamiento de los cilios. Con respecto a la cuarta semana, se aprecia una recuperación en cuanto a la genotoxicidad, aunque cabe mencionar que hay una respuesta heterogénea por parte del pulmón, lo cual se explica con los amplios rangos de la desviación estándar, el mismo comportamiento se ve en la ultraestructura del bronquiolo (fotografía 5), donde es posible observar que vuelve a haber predominio de las células de Clara sobre las ciliadas, las cuales muestran ya una morfología normal. Por otro lado las células de Clara tienden a presentar su morfología normal, es decir, de cuboide a cilíndrica y a mostrar actividad secretora, aunque también se ven células dañadas y restos celulares, lo cual explica la heterogeneidad encontrada en la respuesta genotóxica (gráfica 4).

Cloruro de Cadmio

Con respecto al efecto de la inhalación de este metal, se aprecia un efecto genotóxico significativo desde la primera semana de exposición, aunque con variabilidad en la respuesta; en la ultraestructura del bronquiolo es posible observar una disminución del número de las células de Clara, las cuales muestran una gran actividad proliferativa, puesto que hay muchas células en proceso de mitosis, con respecto a las células ciliadas es posible apreciar que en algunas zonas los cilios están acortados, lo cual se ve en la fotografía 6. Con respecto a la segunda semana, el daño genotóxico permanece constante, aunque hay una mejor significancia estadística, debido a que se presenta mayor homogeneidad en la respuesta; referente a la ultraestructura de esta semana de tratamiento, es posible apreciar en la fotografía 7 que hay una severa alteración en la ultraestructura del bronquiolo, puesto que hay un aplanamiento en las células de Clara y las ciliadas, sin que se observen células muertas; en este caso es importante señalar la presencia de bacterias, lo cual sugiere un proceso de inmunosupresión, o bien, que debido a la falta de cilios las bacterias se acumulan, puesto que ellos son los encargados de transportar por acción mecánica tanto a partículas como a bacterias. En la tercera semana de exposición a cloruro de cadmio, tampoco hay cambio en la respuesta genotóxica como se ve en la gráfica 4, en cuanto al análisis de la ultraestructura es posible observar, que si bien, las células de Clara muestran una mejor apariencia en general, éstas se encuentran recuperando su capacidad secretora, la morfología que presentan no es la característica, además de ser muy escasas. En cuanto a las células ciliadas es posible ver que son estas las que predominan y que algunas se encuentran recuperadas de la cilioforésis (fotografía 8). Si bien en la cuarta semana de tratamiento con cloruro de cadmio el daño genotóxico permanece sin cambios y conservando la significancia estadística (gráfica 4), hay que mencionar que se presenta mayor heterogeneidad en la respuesta genotóxica. La ultraestructura del bronquiolo muestra una recuperación reflejada en el predominio total a nivel superficial de las células de Clara cuya morfología es de cuboide a cilíndrica y con gran actividad secretora, esto se aprecia mejor en la fotografía 9.

Acetato de plomo y Cloruro de cadmio

En la primera semana de exposición, el daño genotóxico causado por la inhalación conjunta produjo un considerable efecto que no mostró gran significancia estadística debido a la variabilidad (gráfica 4), en cuanto a la ultraestructura del bronquiolo, de primera instancia se observa la presencia de bacterias que sugieren inmunosupresión, aunque también existe la posibilidad de que a pesar de estar presentes los cilios, éstos no sean funcionales, puesto que como se ha visto en algunos trabajos, los metales tienen la capacidad de actuar a nivel de la tubulina, la cual esta presente en los cilios. Así mismo, hay igual número de células de Clara y ciliadas, pudiendo observar una disminución en el tamaño de los cilios. Las células de Clara perdieron su capacidad secretora, algunas se encuentran en mitosis y también hay células hipertróficas (fotografía 10). Para la segunda semana de exposición, el daño genotóxico presenta la

misma magnitud pero ahora la respuesta es más homogénea; los cambios ultraestructurales correspondientes a esta semana se aprecian en la fotografía 11, en donde se ve una aparente dominancia por parte de las células de Clara, pero en realidad no es que estén ausentes las células ciliadas, sino que presentan cilioforésis. Las células de Clara muestran una pérdida de la morfología característica y se aprecian células que aparentan estar en proceso de división. En cuanto a la actividad secretora sólo se aprecian algunas vesículas. Después de cinco inhalaciones, el daño al ADN muestra una ligera disminución, aunque no pierde su significancia estadística tal como se ve en la gráfica 4; la ultraestructura que presenta el bronquiolo en éste punto se observa en la fotografía 12, donde es posible apreciar que las células ciliadas comienzan a recuperarse, así como también las células de Clara que ya adquirieron su morfología cuboide característica, así como su capacidad secretora. En número tienden a predominar las células de Clara. En la última semana de tratamiento, continúa habiendo un decremento en la genotoxicidad, aunque sigue habiendo diferencias estadísticas significativas. En éste caso es posible apreciar que el bronquiolo no está totalmente recuperado puesto que aún hay células ciliadas y las células de Clara aunque muestran actividad secretora no adquieren su morfología cuboide, además de que se encuentran algunas células con invaginaciones, tal como se aprecia en la fotografía 13.

En cuanto al análisis estadístico aplicado a los datos, se empleo la prueba de "t" y los resultados obtenidos se muestran en las gráficas 9A, 9B, 9C y en la tabla 7.

Tabla 7.- Significancia estadística determinada mediante la prueba de "t", por efecto de la inhalación de cloruro de cadmio (0.006M) y/o acetato de plomo (0.0001M) durante varias semanas en distintos órganos de ratón CD-1.

ACETATO DE PLOMO

ORGANO	1a semana	2a semana	3a semana	4a semana
Pulmón	+++	-	+++	-
Cerebro	-	-	-	++
Médula	-	-	-	-
Riñón	-	-	+	+
Hígado	++	++	+++	++
Sangre	-	+	-	-
Testículo	-	-	-	-
Nasales	-	-	-	-

CLORURO DE CADMIO

ORGANO	1a semana	2a semana	3a semana	4a semana
Pulmón	++	+++	+++	++
Cerebro	++	++	++	++
Médula	+++	++	+++	+++
Riñón	-	+++	+++	++
Hígado	+	+	+	+++
Sangre	+++	++	+++	+++
Testículo	+++	+++	+++	+++
Nasales	++	++	+++	-

ACETATO DE PLOMO Y CLORURO DE CADMIO

ORGANO	1a semana	2a semana	3a semana	4a semana
Pulmón	+	+++	+++	+++
Cerebro	+++	+++	+++	+++
Médula	+++	+++	+++	+++
Riñón	++	+++	+++	++
Hígado	+++	+++	++	+++
Sangre	+	+++	+++	++
Testículo	++	+++	+++	+++
Nasales	+++	+++	-	+++

- no hay diferencias ($p > 0.05$), +diferencias significativas ($p < 0.05$), ++diferencias muy significativas ($p < 0.001$), +++ diferencias extremadamente significativas ($p < 0.0001$)

DISCUSION

Como se mencionó en los antecedentes de genotoxicidad tanto del plomo, como del cadmio, no hay datos contundentes en cuanto a su potencialidad mutagénica, genotóxica y carcinogénica, puesto que estos varían mucho de un sistema a otro, así como también dependen de la vía de exposición. Tal es el caso de animales tratados con plomo por diferentes vías de exposición, por vía intramuscular produce tumores sólidos, por vía intraperitoneal induce sarcomas y mesoteliomas, mientras que la vía de inhalación que es más importante no lo hace (Skerfving, 1987). Por otro lado es importante considerar que aún empleando la misma vía de exposición el organismo empleado responde de diferente manera. Oberdöster (1994), reporta que la inhalación de cloruro de cadmio tiene diferente efecto en cuanto a la respuesta inflamatoria y proliferativa así como también la inducción de metalotioneína pulmonar en rata y ratón. Por tal motivo en este trabajo una de las pretensiones fue, determinar si a través de la vía de exposición inhalatoria el efecto genotóxico es el mismo que el reportado en otros trabajos donde la vía de exposición fue intraperitoneal, o bien, a través del alimento y de esta forma determinar si la distribución del daño varía dependiendo de la ruta de exposición. En las gráficas 9A, 9B y 9C, se muestra de manera resumida que tipo de tratamiento (9A acetato de plomo, 9B cloruro de cadmio y 9C la mezcla de ambos), indujo mayor daño genotóxico a manera de rompimientos de una cadena de ADN en cada uno de los órganos empleados (células nasales, pulmón, sangre, hígado, riñón, cerebro, médula ósea y testículo).

Acetato de plomo. El tratamiento agudo produjo daño genotóxico únicamente en dos órganos, el pulmón y el hígado (gráfica 9A), el efecto encontrado en pulmón era de esperarse ya que por el tamaño de la partícula ($5\mu\text{m}$) esta se deposita a nivel de las vías respiratorias inferiores como se ve en el esquema 1 (Nordberg, 1987). Con respecto al tratamiento subcrónico (gráfica 9A), en el pulmón el daño disminuye en la segunda semana y en la tercera vuelve a incrementar, desapareciendo en la cuarta semana. Estos resultados correlacionan con las alteraciones ultraestructurales del bronquiolo, lo cual nos indica un posible proceso de adaptación al daño causado en las primeras semanas. Probablemente el daño genotóxico detectado muestre dicho comportamiento porque al trabajar con el órgano completo se manejan más de 60 tipos celulares simultáneamente, por lo cual se obtienen respuestas heterogéneas debidas a la presencia de subpoblaciones con sensibilidad diferencial al plomo.

Es importante destacar que el daño en hígado fue considerable en las cuatro semanas de tratamiento lo cual nos indica que los mecanismos de detoxificación propios del órgano, no son capaces de eliminarlo, es decir, que la metalotioneína hepática no tiene mucha afinidad por el plomo, tal como se ha reportado por Goyer, 1991. Como una consecuencia de este posible proceso se ve en el riñón una inducción del daño en las últimas dos semanas, lo cual esta de acuerdo con lo reportado en la bibliografía en cuanto a que el hígado y el riñón son los órganos en los que hay una mayor acumulación de plomo (Skerfving 1988), por lo tanto en ellos hay más posibilidad de ejercer un efecto genotóxico puesto que el tiempo de

exposición al que se encuentran sujetos es mayor, además de que estos son órganos con alta actividad metabólica. A este respecto hay que considerar que numerosos estudios tienen descrita la interacción del plomo con enzimas intermediarias del metabolismo y muchos de los efectos tóxicos del plomo "in vivo" se atribuyen a modificaciones de este tipo de procesos celulares.

Alteraciones en la energía del metabolismo y en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos pueden ocurrir por exposición a plomo. Por otro lado, estudios de rastreo de la distribución de plomo "in vivo" sugieren relativamente libre acceso y una distribución preferencial del metal a mitocondria de varios tejidos, entre ellos hígado y riñón, en ella altera funciones como el desacople de la fosforilación oxidativa, inhibición de la oxidación del sustrato y modificación en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y transporte iónico, particularmente de calcio. El transporte activo de plomo en mitocondria parece estar asociado con el sistema de transporte de calcio y por lo tanto puede inferir en la regulación mitocondrial de calcio, todo lo mencionado anteriormente puede jugar un papel importante en la carcinogénesis a largo plazo (Skerfving, 1988).

La sangre y la médula sólo son dañadas de manera considerable en la segunda y tercera semana respectivamente, lo cual puede deberse a que para presentarse daño en estos tejidos debe haber la acumulación del metal en ellos por periodos prolongados, además, una vez que el plomo pasa al torrente sanguíneo es mediante él que se distribuye a los diferentes órganos, por lo cual se encuentra en recambio constante. El daño genotóxico evaluado en leucocitos de sangre entera no fue de gran magnitud y mostró un comportamiento inestable lo que puede deberse a que el 2% del plomo absorbido en sangre se encuentra asociado a proteínas plasmáticas y el 98% restante a eritrocitos y el método empleado para evaluar genotoxicidad es aplicable a células nucleadas y los eritrocitos no lo son, por este motivo es muy probable que el daño en este tejido esté subvaluado. Referente al efecto positivo detectado en la médula ósea, se puede explicar por el papel del plomo en la inhibición de la ferroquelatasa, enzima involucrada en la incorporación de grupos Fe a las protoporfirinas tanto en sangre como en médula ósea (Harrison, 1983). Otra posibilidad, es que tal como propone Hartwig (1995), el plomo interviene en la reparación postreplicativa del ADN y como sabemos, la médula ósea es un tejido en constante proliferación donde las células constantemente están sujetas a dicho mecanismo.

El cerebro es un órgano blanco para el plomo, el cual por mimetizar al ión calcio le facilita el paso a través de las membranas y específicamente en este órgano las meninges, y una vez dentro se transporta como un neurotransmisor y altera procesos fisiológicos normales y de manera indirecta causar un daño genotóxico, esta podría ser una posibilidad aunque hay reportes de efectos más específicos como el reportado por Rajanna-B y colaboradores (1995), donde se plantea que el plomo a concentraciones micromolares inhibe a la proteína cinasa C (PKC), la cual regula una variedad de señales extra e intracelulares para atravesar las membranas neuronales, puesto que la PKC al requerir calcio y fosfatidilserina para su activación toma al plomo en lugar del calcio y de esta manera puede ejercer un daño al ADN de forma indirecta. Si consideramos que el efecto fue incrementando con el tiempo, esto nos indica que primero debe de haber una

acumulación del metal y por otro lado como el efecto se produce de manera indirecta requiere más tiempo para poder ser detectado a nivel genotóxico.

El no haber encontrado un efecto genotóxico de importancia en las células del epitelio nasal puede explicarse por el tamaño de las partículas, las cuales por sus dimensiones tienen acceso a las vías respiratorias inferiores y probablemente el efecto que se detectó sea el reflejo de una respuesta inflamatoria leve, en la cual se produce poco estrés oxidativo que causa rompimientos al ADN.

En cuanto al efecto detectado en testículo no es posible plantear un efecto reprotóxico por la inhalación de acetato de plomo, además de que los efectos reportados en cuanto a reproducción se han evaluado en la progenie y no tanto en los organismos o individuos expuestos, lo cual nos indica que el plomo no tiene una función específica en éste órgano.

Cloruro de cadmio. En relación a la genotoxicidad causada por la inhalación del cloruro de cadmio, hay que destacar que tiene mayor efecto que el tratamiento con acetato de plomo, lo cual es evidente al comparar las gráficas 9A y 9B, donde únicamente hay dos resultados negativos, los cuales corresponden al efecto causado en el riñón durante la primera semana y en las células nasales en la cuarta semana. En cuanto a lo observado en las células nasales es posible plantear que haya un proceso de adaptación después de las primeras semanas de exposición, puesto que al presentarse heterogeneidad en los datos esto nos sugiere que hay células con mucho mayor daño que otras, lo cual nos habla de diferentes susceptibilidades a nivel de subpoblaciones celulares. Referente a este mismo tipo celular un factor importante por el cual, a pesar de ser estas las células con las que el metal tiene el primer contacto y no haber detectado un daño genotóxico de gran magnitud puede explicarse por el hecho de que en epitelios de mucosas hay una alta concentración de metalotioneina, lo cual es un mecanismo de protección que va a depender de la afinidad del metal y la metaloenzima, pero como ya se ha reportado el cadmio es el metal que tiene mayor afinidad por dicha enzima (Foulkes, 1994). Con respecto al efecto del cadmio en la inducción de rompimientos de ADN en pulmón, se aprecia una dosis respuesta (gráfica 4), donde se determinan diferencias estadísticas significativas en las cuatro semanas de tratamiento, tal como se observa en la gráfica 9B. Estos resultados pueden sustentarse con lo reportado por Oberdóster (1994), él concluye que si bien la inhalación de cloruro de cadmio tiene efecto diferencial entre especies (rata y ratón), el ratón muestra una mayor respuesta inflamatoria y proliferativa, así como una mayor expresión de metalotioneina en células bronquiales y epiteliales del alveolo. Al respecto también se menciona que citocinas proinflamatorias tales como el TNF- α y la IL-1, inducen a la metalotioneina, esto indica que para que comience a darse un proceso de detoxificación por parte de las metaloenzimas primero debe de presentarse un proceso inflamatorio; en el cual se producen radicales libres y ser estos los que causen rompimientos en el ADN, por este motivo empleando el ensayo cometa se puede detectar el daño inmediatamente después del proceso inflamatorio y antes de que pudiera presentarse un proceso de detoxificación por parte de la metalotioneina pulmonar.

Por otro lado es importante mencionar que si bien el efecto detectado en sangre presenta heterogeneidad en algunos casos, este es muy significativo en todas las

semanas de exposición, lo cual nos indica que el metal se encuentra en constante distribución, puesto que lo hace formando complejos con proteínas plasmáticas, más aún cuando se administra en forma de sal clorada, es decir, cloruro de cadmio (Foulkes, 1994).

En el riñón el daño se presentó a partir de la segunda semana, este comportamiento va de acuerdo a lo reportado por Foulkes (1991), él propone que la acción nefrotóxica de metales pesados como el cadmio comienza después de haber una disminución de la concentración del metal, posterior a la administración, es decir, después de una administración inicial de cadmio con una acumulación intracelular de 25 $\mu\text{g/g}$ en la corteza, se presenta una inhibición del transporte de aminoácidos sólo después de 6 horas. En contraste la panaaminoaciduria se ha visto a lo largo de 36 horas de seguimiento intravenoso de cadmio cuando la concentración es de 12 $\mu\text{g/g}$. Lo anterior explica el porqué se detecto daño después de la primera inhalación. Por otro lado, el mismo autor en 1994, propone que al administrar cloruro de cadmio, el metal se une inmediatamente a proteínas plasmáticas y subsecuentemente se une a otros tejidos, pero no en riñón. Estos mecanismos no excluyen la posibilidad de que el metal se acumule en el órgano donde puede ejercer algún daño, puesto que se conocen algunas formas de secuestro y consecuentemente posibles caminos de detoxificación, como por ejemplo el hecho de que quelantes de bajo peso molecular como la metalotioneina, mercaptoetanol y glutatión se hayan encontrado asociadas al metal en el riñón, básicamente en el espacio vascular (Foulkes, 1994).

El comportamiento que presentan las células del hígado es muy interesante, puesto que el daño se va incrementando de manera dosis respuesta, quizá con la primera exposición se indujeron las metaloenzimas, así como también los mecanismos de reparación, permaneciendo en el mismo estado durante una semana, pero debido a la continua exposición el depósito del cadmio superó la capacidad reparativa de las células así como también produjo una saturación de la metalotioneina, por lo cual el daño fue mayor en la cuarta semana de exposición. Esta suposición se puede sustentar con lo reportado por Bucio y colaboradores (1995), quienes encontraron alteraciones ultraestructurales por la exposición a cadmio en el retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias de células WRL-68, las cuales son una línea celular hepática fetal, así mismo detectaron una considerable inducción de metalotioneina.

Con respecto al efecto observado en testículo, es importante mencionar, que Blazina, (en prensa) reporta que la inyección intraperitoneal de cloruro de cadmio induce una disminución en el número de espermatoцитos y espermátidas, así como también induce la muerte de las células de Leydig y un efecto sobre la vascularización temprana testicular en ratones CD-1, esto podría explicar el porqué se determinó un efecto genotóxico evaluado como rompimientos de una cadena de ADN, el cual, presentó gran significancia estadística, debido a la homogeneidad de los datos, pero cuya magnitud no fue muy elevada, lo cual sugiere que la magnitud del daño clastogénico en testículo si depende de la ruta de exposición.

Un comportamiento semejante lo presenta la médula ósea, lo cual muestra un potencial clastógeno del cloruro de cadmio en dicho órgano, a diferencia de lo que menciona Blazina(en prensa), puesto que propone que el cloruro de cadmio administrado vía intraperitoneal en ratones CD-1 es un débil coclastógeno con ciclofosfamida evaluando la inducción de micronúcleos. Esto nos indica que la ruta de exposición puede ser una variable importante para causar rompimientos en el ADN, así como también sugerir que la evaluación con el ensayo cometa es más sensible que la evaluación realizada mediante la prueba de micronúcleos per se. Por otro lado el que la magnitud del daño no haya sido muy alto, puede explicarse por el hecho de que las células al estar en continua proliferación siempre tienen inducidos sus mecanismos de reparación en mayor grado que otro tipo celular. Otra posibilidad es la posible presencia de una proteína de bajo peso molecular similar a la metalotioneína que se ha detectado en médula ósea posterior a la inyección subcutánea de cloruro de cadmio (Tamura, 1995), lo cual significaría un mecanismo detoxificador.

Cloruro de cadmio y acetato de plomo. Analizando el efecto de la inhalación conjunta de acetato de plomo y cloruro de cadmio es posible indicar que en general si hay un efecto sinérgico, el cual se muestra en la gráfica 9C, donde es posible apreciar que el único dato negativo en cuanto a significancia lo presenta las células nasales en la tercera semana de exposición, debido a la presencia de una respuesta heterogénea.

Con respecto al efecto causado en pulmón por ambos metales, se puede apreciar que si bien es significativo en todas las semanas hay una tendencia hacia la recuperación, lo cual se puede explicar si las metalotioneínas pulmonares se inducen en respuesta a la síntesis de citocinas de la respuesta inflamatoria.

En la primera semana de tratamiento la sangre es uno de los tejidos que presenta menor daño si se considera la significancia estadística, probablemente porque los metales se están asociando rápidamente a las diferentes proteínas plasmáticas con las que tienen afinidad y por tal motivo la susceptibilidad a nivel de subpoblaciones celulares se refleja en la heterogeneidad de la respuesta genotóxica.

Un dato que resalta sobre los demás es la alta respuesta sinérgica apreciada en el riñón por efecto de la exposición aguda, es decir en la primera semana, el daño en este órgano nos indican que a diferencia de lo visto en los tratamientos individuales, el efecto de la mezcla no puede ser detoxificado por las metaloenzimas. Lo cual da pauta para realizar investigaciones en cuanto a los efectos toxicológicos y genotóxicos de mezclas.

Lo mismo sucede con el hígado, pero éste presenta un daño de gran significancia a partir de la primera y segunda semana, y en las siguientes tiende a disminuir, quizá porque se inducen metaloenzimas suficientes como para transportar y quelar el efecto de los metales.

El efecto en la médula ósea presenta un mayor efecto que los tratamientos individuales lo cual sugiere que al ser un tejido en constante proliferación, el efecto se ejerce en los mecanismos de reparación, puesto que ambos metales

pueden ejercer efecto sobre ellos de manera simultánea tal como lo sugiere Hartwig (1995).

El testículo presenta un mayor efecto en el caso de la inhalación conjunta que con los tratamientos individuales, esto indica que si bien se obtienen resultados de mayor magnitud cuando el tratamiento se da por vía intraperitoneal, la exposición inhalatoria tiene la capacidad de afectar cualquier tejido.

Con objeto de plantear un mecanismo de acción probable por parte de ambos metales en base a los datos obtenidos y a los mencionados en la bibliografía, Martell en 1981 propone que el daño al ADN puede ocasionarse de manera directa o indirecta, en éste caso es a través de la influencia de los metales sobre eventos metabólicos que llevan a la inducción de daño. Si se trata de un metal pesado puede unirse al ADN por interaccionar de manera directa con grupos fosfato de la desoxiribosa, y para otro tipo de metales, la unión se da con una variedad de grupos donadores de electrones en las bases, de tal forma que si se trata de pirimidinas la unión es en el N(3) o en el O (2) y para las purinas es en el N (7) o en el N (1) (Martell, 1981). El efecto genotóxico puede ser causado de manera indirecta, tal como lo plantea Hartwig, 1994, él propone que la genotoxicidad está dada por la interacción del plomo con los procesos de prolimerización y ligación, lo cual se traduce en una acumulación de rompimientos de ADN, específicamente menciona que el efecto del plomo puede ser la inhibición de la polimerasa β . Por otro lado reporta que el cadmio actúa a nivel de esta misma enzima, por lo cual también causa una acumulación de rompimientos, además plantea que el cadmio inactiva a la O⁶-metilguanina-DNA metil transferasa (MGTasa). Por otro lado tanto el plomo como el cadmio tienen la capacidad de intervenir en procesos reguladores de calcio, involucrados en la regulación de la replicación y reparación del ADN. Por lo cual, si se retoman los resultados obtenidos de la genotoxicidad ocasionada en los diferentes órganos, se puede ver que ambos metales tienen efecto, en mayor o menor grado, por lo cual es posible pensar que debido a que cada tipo celular tiene capacidades diferentes en cuanto a actividad proliferativa y reparativa, según sus necesidades, es probable que por ello, el efecto sea diferencial. Aunque no hay que dejar de considerar que la vía de exposición es importante y que los datos que se tienen para dilucidar el posible mecanismo de acción se basan en pruebas "in vitro", por lo cual resultaría interesante evaluar parámetros a nivel molecular a partir del empleo de un modelo in vivo, lo cual nos respondería la incógnita de que los mecanismos de reparación y proliferación dependen básicamente de las interacciones intracelulares más que de las intercelulares. En este trabajo se trabajó con órganos completos para detectar daño a dicho nivel, pero es importante considerar que el ensayo cometa, es una técnica lo suficientemente versátil para detectar daño a nivel de subpoblaciones celulares, lo cual es aplicable para detectar efectos a nivel muy específico y responder preguntas en cuanto a posibles mecanismos de acción, además, cuando se trabaja con tipos celulares específicos, la interpretación de los datos se facilita, puesto que de ésta manera no se presenta heterogeneidad en la respuesta genotóxica evaluada.

CONCLUSIONES

- La inhalación es una vía de acceso importante para xenobióticos que pueden ocasionar efecto a nivel sistémico.
- La inhalación de acetato de plomo 0.001M, cloruro de cadmio 0.006M y acetato de plomo-cloruro de cadmio, producen daño al ADN en diferentes órganos de ratón CD-1.
- El cloruro de cadmio presentó mayor potencial genotóxico que el acetato de plomo.
- Se observa un efecto sinérgico principalmente en el riñón en la fase aguda de la exposición.
- De acuerdo con la exposición los órganos afectados varían.
- El órgano que presentó más rompimientos de una cadena de ADN por la inhalación aguda de los diferentes metales fue:
médula - cloruro de cadmio
pulmón - acetato de plomo
riñón - acetato de plomo y cloruro de cadmio
- El órgano que presentó mayor daño genotóxico a manera de rompimientos de una cadena de ADN por la inhalación subcrónica de los diferentes metales fue:
leucocitos - cloruro de cadmio
cerebro - acetato de plomo
hígado - acetato de plomo y cloruro de cadmio
- En el caso del pulmón, órgano con el que se tiene el primer contacto hay una alta correlación entre la evaluación de daño genotóxico y las alteraciones morfológicas en el pulmón.

BIBLIOGRAFIA

- Baker R.S. Evaluation of metals in in vitro assays, interpretation of data and possible mechanisms of action. *Curr. Top. Environ. Toxicol. Chem.* 8:185-206 (1985)
- Barile. *Citotoxicity*. CRC, New York USA (1994)
- Binder S. Hazards of low level lead exposure recognized. *Am. J. Public Health.* 82:1043-1044 (1992)
- Blazina S., G. Ficsor y J. Crowell. Cadmium chloride treatment enhances the clastogenicity of cyclophosphamide in mouse bone marrow cells. (en prensa)
- Browder A., M. Joselow y D. Louria. The problem of lead poisoning. *Medicine.* 52:121-139 (1973)
- Brusick D. *Principles of Genetic Toxicology*. Plenum Press. U.S.A. p 284 (1987)
- Bojian W., Robert T.Ch. y S.W. Sookup. Studies of Cytogenetic Effects of Sodium Arseniacals on Mammalian cells in vitro. *Environmental Mutagenesis.* 4: 493-498 (1982)
- Bucio L., M. Souza, A. Albores, A. Sierra, E. Chávez, A. Cárabez y M.C. Guitiérrez-Ruiz. Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology.* 102(3):285-299 (1995)
- Burgos R.A., *Partículas suspendidas*. Información científica y tecnológica. Vol 8, n° 115. México 22-23 (1986)
- Burns L.A. y Munson, A.E. Gallium arsenide selectively inhibits T cell proliferation and alters expression of CD25 (IL-2R/p55). *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics.* 225:178-186 (1993)
- Carbajal L., A. Loredo y L. González. El plomo como causa de intoxicación aguda y crónica en la niñez. *Acta Pediátrica Mexicana.* 127:211-213 (1984)
- Carson B.L., H.V. Ellis III y J.L. McCann. *Toxicology and Biological Monitoring of metals in humans. Including Feasibility and Need*. Lewis Publishers, INC. U.S.A. p 328 (1987)
- Clarkson W.T., L. Friberg, G. F. Nordberg y P.R. Sager. *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Plenum Press. New York, U.S.A. pp 2-7 (1988)
- DeFlora S. Study of 106 organic and inorganic compounds in the salmonella / microsome test. *Carcinogenesis.* 2:283-293 (1981)

- Ennever F. K. y H. S. Rosenkranz. Evaluating batteries of short-term genotoxicity test. *Mutagenesis*. 1:293-298 (1986)
- Fawcett M.D. Tratado de histología. Interamericana. México pp 1026 (1988)
- Fishbein L. ; Furt A. and Mehlman M.A. Genotoxic and carcinogenic metals: environmental and occupational occurrence and exposure. Princeton Scientific Publishing Co. Inc. U.S.A. pp 339. (1987)
- Flessel C.P. Metals as Mutagens. In: Inorganic and Nutritional Aspects of Cancer (G.N. Schrauzer, ed). Plenum Pub. Corp., New York. pp 117-128 (1978)
- Formi A., A. Sciame y P. Bertazzi. Chromosome and biochemical studies in women occupationally exposed to lead. *Arch. Environ. Health* 35:139-146 (1980)
- Fortoul T.I, et al. Metals in lung tissue from autopsy cases in Mexico city residents: Comparison of cases from the 1950 and 1980's. *Environ. Health Persp.* 104:630-632 (1996)
- Fortoul T.I., O. Saldívar, R.G. Ponciano, T. A. Tovar, V.D. Salazar, C.R. Salgado, R.E. Oliva y S.O. Rivero. Determinación de metales pesados en tejido pulmonar de casos de autopsias y alteraciones inducidas por plomo. La importancia biológica de los iones inorgánicos. Morelia. Univ. Michoacana de San Nicolás Hidalgo. (1994)
- Foulkes, E.C. Biological Effects of Heavy Metals. Volume II. Metal Carcinogenesis. CRC Press, Inc. Florida, USA. pp. 129-152 (1990)
- Foulkes, E.C. Nature of Cd and Hg effects on epithelial amino acid transport in vivo and role of chelators. *Toxicology*. 69:177-185 (1991)
- Foulkes, E.C. Epithelial transport of heavy metals. *Advances in Comparative and Environ. Physiol.* 20:55-84 (1994)
- Furst A. and Radding S.B. New development in the study of metal carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health, Pt.C-Environ. Carcinogenesis*. 2:103-133 (1984)
- Galvao L. y G. Corey. Cadmio. Serie vigilancia IV. Centro Panam. de Ecol. Hum. y Salud. México pp 1-69 (1987)
- Gebhart E. Chromosomal damage in individuals exposed to heavy metals. *Toxicol. Environ. Chem.* 8:253-266 (1984)

- Gebhart E. y T. Rossman. Mutagenicity, carcinogenicity, teratogenicity. VCH Verlagsgesellschaft mbH p. 617-640 (1991)
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Herrera, L. A., Montero, R., Rojas, E., Cebrián, M.E. y Ostrosky-Wegman, P. Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation, *Mutat. Res.*, 283:91-95 (1992)
- Gonsebatt B. M.E. Marcadores biológicos de exposición a arsénico inorgánico. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias (Biología). pp 68. (1994).
- Goyer A. R. Cap 19 in Amdur O.M.; J. Doull; C.D. Klaassen. Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Pergamont Press. U.S.A. pp 623-680 (1991)
- Hamm A. Histology. Interamericana pp935 (1988)
- Hansen K. y R.M. Stern. A survey of metal-induced mutagenicity in vitro and in vivo. *J. Am. Coll. Toxicol.* 3:381-430 (1984)
- Hartwig A. Role of DNA repair inhibition in lead and cadmium induced genotoxicity: A review. *Environ. Health Perspect* 102 (Suppl 3):45-50 (1994)
- Hartwig A. Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals* 8:3-11 (1995)
- Homninki H. Environmental carcinogenesis, in: Cooper C., Grover P. Chemical carcinogenesis and mutagenesis I. Springer Verlaner , Berlin, Germany. pp 36-61 (1990)
- Klassen, C.D. y Eaton, D.L. Principles of Toxicology, en: Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of Poisons, M. O. Amdour, J. Doull y C.D. Klassen (Eds.), Pergman Press 4ta ed, New York, USA. pp. 12-49 (1991)
- Köliker A. Special histology of the lungs. In manual of human histology. Trans. y De. G. Busk y T. Huxley. vol II pp 160-180 (1853)
- Leonard A.; Gerber G.B.; Jacquet P. et al. Carcinogenicity, mutagenicity, and teratogenicity of industrially used metals. In: Carcinogenicity, Mutagenicity, and Teratogenicity of industrial Pollutants (M. Kirsch-Volders, ed.), Plenum Press, New York. pp 59-126 (1984)

Loomis, D. P., V.H. Borja-Aburto, S.I. Bangdiwala y C.M. Shy. Is increased mortality associates with ozone exposure in Mexico city?. Health Effects Institute Research Report Number 75 (1996)

Mahaffey K. Relation between quantities of lead ingesting and health effects of lead in humans. Pediatrics 59:448-455 (1977)

Maki-paakkanen J., M. Sorsa y H. Vainio. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in lead exposed workers. Hereditas 94:269-275 (1981)

Martell E.A., Chemistry and metabolism of metals. Relevant to their carcinogenicity. Environ. Health Perspect. 40:27-34 (1981)

Martin D.W. Porphirinas y pigmentos biliars. En Martin D.W., P. Mayes y V. Rodwell. Manual moderno "Bioquímica de Harper", capítulo 24. México pp 318-333 (1984)

Mckelvey-Martin V.J.; M.H.L.Green; P.Schmezer; B.L.Pool-Zobel; M.P. DeMéo and A. Collins. The Single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. Mutat. Res. 288:47-63 (1993)

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

Moncada, S. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM (1994)

Niden A.H. Bronchiolar and large alveolar cell in pulmonary phospholipid metabolism. Science 158:1323-1324 (1976)

Nordberg G.F. y M. Nordberg. Biological monitoring of cadmium, en Clarkson T.W., L. Friberg, G.F. Nordberg y P.R. Sager. biological monitoring of toxic metals. Plenum Press, New York, USA pp 169-197 (1988)

NRC, National Research Council. Biological Markers in Reproductive Toxicology, Commission on Life Sciences, National Academic Press, Washington, D.C. pp. 15-29 (1989)

NRC, National Research Council. Commission on Life Sciences, Board on Environmental Studies and Toxicology, Subcommittee on Immunotoxicology

- Committee on Biological Markers. *Biological Markers in Immunotoxicology*, National Academic Press, Washington, D.C. pp. 68-71 (1992)
- Oberdöster G., M.G. Cherian y R.B. Baggs. Correlation between cadmium-induced pulmonary carcinogenicity, metallothionein. A species comparison. *Environ. Health Perspect.* 102(Suppl 3):257-263 (1994)
- Okui T.; Fujiwara Y. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 172:69-76 (1986)
- Olaiz et al. Concentración de plomo en sangre. Estudio en escolares de la Cd. de México. VI Congreso Nacional de Investigación en Salud Pública. Cuernavaca, Morelos. México (1995)
- Östling O. y K.J. Johanson. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individuals mammalian cells. *Biochem.Biophys. Res. Commun* 123:291-298 (1984)
- Ostrosky-Wegman P., Montero R., Palao A., Cortinas de Nava C., Hurtado F y Albertini R. 6-Thiuanine resistant T-lymphocyte autoradiographic assay. Determination of variation frequencies in individuals suspected of radiation exposure. *Mutat. Res.* 232:49-56 (1990)
- Ostrosky-Wegman P., Gonsebatt M.E., Montero R., Vega L., Barba H., Espinosa J., Palao A., Cortinas C., García-Vargas G., del Razo L.M. y Cebrian M. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutat. Res.* 250:477-482 (1991)
- Petres J., Barron D. y Hagedorn M. Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation; citogenetic and biochemical studies. *Environ. H. Perspec.* 19:227-233 (1977)
- Petres J.D., D. Baron y M. Hagedorn (b). Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation citogenetic and biochemical studies. *Environ. Health Perspect.* 19:223-227 (1977)
- Pomroy C., Charborneaus S. M., Mc Cullough R.S. y Tam G.K. Human retention studies with As 74. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 53:550-556 (1980)
- Preston V. y R. Ahokas. Effects of dietary lead and zinc on organ fetal growth. *Am. J. Obst. Gynecol.* 136:889-896 (1980)

Rajanna-B., C.S. Chetty, S. Rajanna, E. Hall, S. Fail y P.R. Yallapragada. Modulation of protein kinase C by heavy metals. *Toxicol. lett.* 81(2-3):197-203 (1995)

Roldán E. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite associations in human lymphocytes cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* 245:61-65 (1990)

Romieu et al. *Arch. Environ. Health* 47:246 (1993)

Rossman T.G., Meyn M.S. y Troll W. Effects of arsenite on DNA repair in *Escherichia coli*. *Environ. Health Perspec.* 19:229-233 (1977)

Rossman, T.G., D. Stone, M. Molina y W. Troll. Absence of arsenite mutagenesis in *E. coli* and Chinese hamster cells. *Environ. Mutagen.* 2:371-379 (1980)

Rossman T.G. Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol. Toxicol.* 2:1-9 (1989)

Saldivar R.L., M. Luna, E. Reyes, R. Soto y T.I. Fortoul. Cadmium determination in mexican produce tobacco. *Environ. Res.* 55:91-96 (1990)

Salgado. Tesis de Especialidad. Facultad de Ciencias. UNAM (1992)

Sánchez, Y. Cloruro de cadmio inhalado y daño bronquiolar. Estudio experimental agudo con diferentes dosis en ratón. Tesis para obtener el grado de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM (1994)

Schiller C.M., Fowler B.A. y Woods J.S. Effects of arsenic on pyruvate dehydrogenase activation. *Environ. Health Perspec.* 19:205-207 (1977)

Sharma A. y Talukder G. Effects of metals of chromosomes of higher organisms. *Environ. Mutagen.* 9:191-226 (1987)

Singh N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice y E.L. Schneider. A simple technique for Quantitation of Low levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-191 (1988)

Singh N.P., D.B. Danner, R.R. Tice, L. Brant y E.L. Schneider. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res.* 237:123-130 (1990)

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

Smith P., D. Heat y H. Moosavi. The Clara cell. Thorax 29, 147:163-174 (1974)

Swans A. Protective effect of selenium against arsenic induced chromosomal damage in cultured human lymphocytes. Hereditas. 98:249-252 (1983)

Tamura Y. y K. Ohya. Study on cadmium- induced metallothione in-like protein in bone marrow of rabbit. Kokubyo-Gakkai-Zusshi. 62(3):404-409 (1995)

Te-Chang Lee, Noriho Tanaka, P. W. Lamb, Tona M. Gilmer, J. Carl Barrett. Induction of Gene Amplification by Arsenic. Science. 241: 79-81 (1988)

Tice, R.R., et al. En Biological Reactive Intermediates IV Molecular and Cell effects and their impact on human health. Plenum Press. pp. 157-164 (1991)

Tice R.R. The single cell gel/Comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individuals cells. Environ. Mutagen. P.H. Phillis and S. Venitt, eds. Bios Scientific LTD. Oxford U.K. pp 315-399 (1995)

Timbrell J.A. Introduction to toxicology. Taylor & Franci Ltd. London p 167 (1995)

Toyo Okui and Yoshisada Fujiwara. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells. Mutat. Res. 172:69-76 (1986)

Vahter M., Norin H. Metabolism of 74 As-labeled trivalent and pantavalent inorganic arsenic in mice. Environ. Res.21:446-457 (1980)

Vega G.S. Evolución epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Toxicología III. Aspectos específicos de la toxicología de algunos contaminantes. Centro Panamericano de ecología humana. p 198 (1985)

Vega L.L. El arsénico en la proliferación "in vitro" de linfocitos humanos. Tesis de licenciatura para obtener el grado de biólogo. pp 63 (1991)

Walder B. K., M.R. Robertson y J. Jeremy. Skin cancer and immunosuppression. Lancet. II:1282-1283 (1971)

Wanner H.U. Effects of atmospheric pollution on human health. Experientia 49:754-758 (1993)

Wen W. N., T-L. Lieu, H- J. Chang, S.W. Wu, M-L. Yau y K.Y. Jan. Baseline and sodium arsenite-induced sister chromatid exchanges in cultured lymphocytes from patients with Black foot disease and healthy persons. *Human Genetics* 59:201-203 (1981)

WHO Revision of the WHO guidelines for drinking water quality. Report of the final task group meeting. Geneva, Switzerland (1992)

Wischnitzer S. Introduction to Electron Microscopy. Pergamon Press. New York, USA. pp. 292 (1970)

World Health Organization. Arsenic. Environmental Health Criteria 18. World Health Organization. Geneva, Italy (1981)

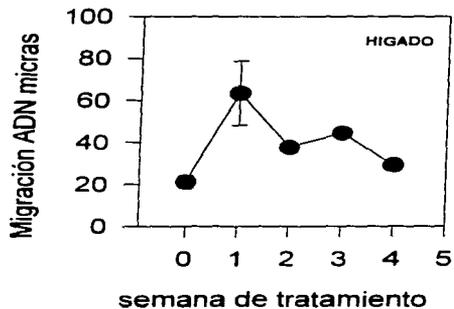
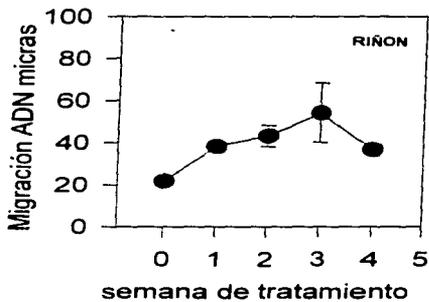
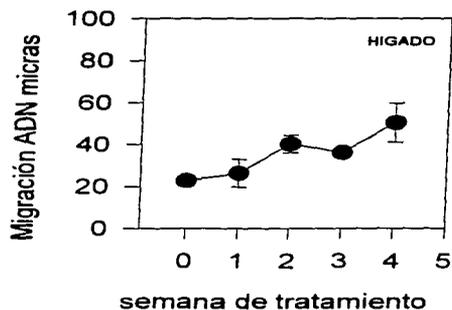
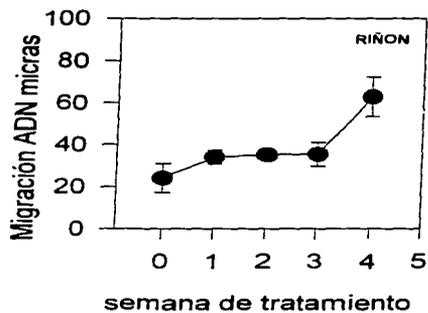
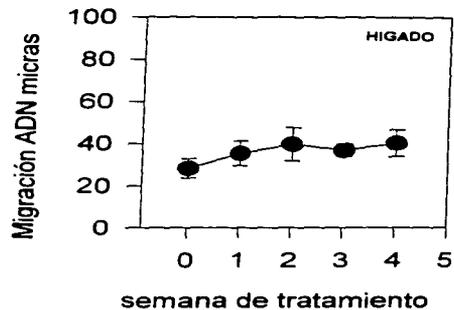
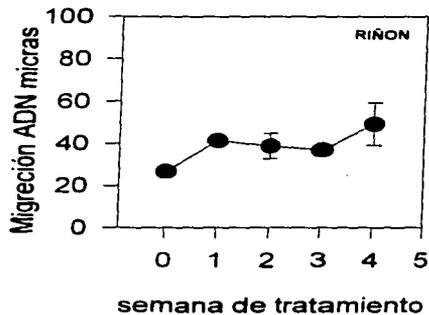
Young S.L., E.K. Fram y S.H. Randell. Quantitative threedimensional reconstruction and carbohydrate cytochemistry of rat nonciliated bronchiolar (Clara) cells. *A.M. Rev. Respir. Dis.* 133:899-907 (1986)

Zanzoni F. y Jong E.G. Arsenic elevates the sister chromatid exchange rate in human lymphocytes in vitro. *Arch. Dermatol. Res.* 267:91-95 (1980)

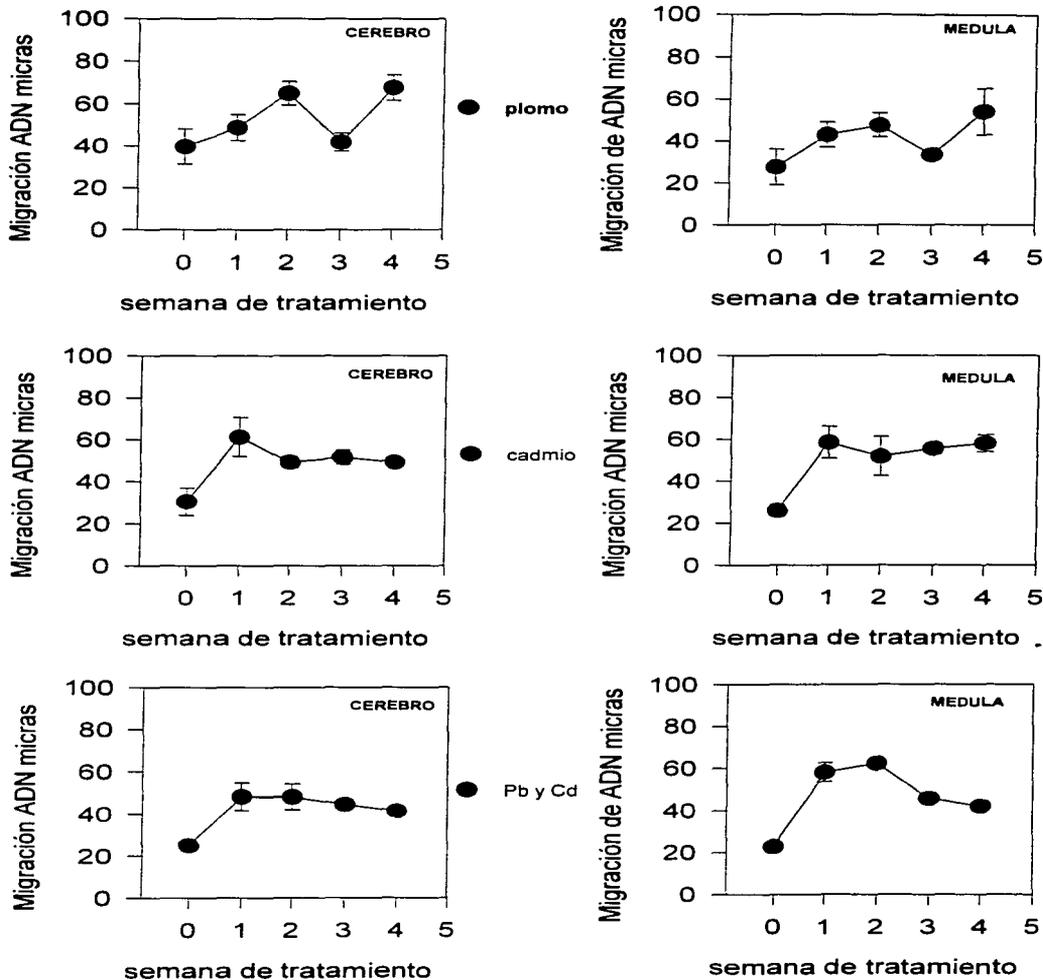
Zar J. H. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, Englewood Cliffs New Jersey. p 718 (1989)

Zúñiga M.A., D. González y G. Molina. Erythrocyte protoporphyrin IX as a diagnostic and therapy evaluating tool in lead poisoning. *Arch. Environ. Health* 36:40-43 (1981)

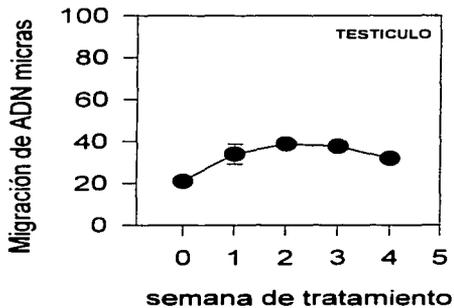
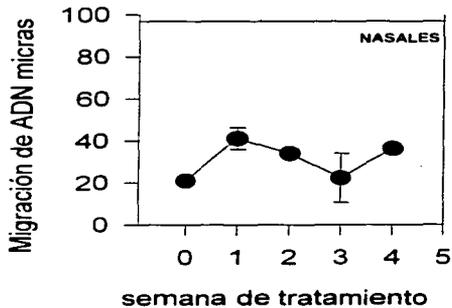
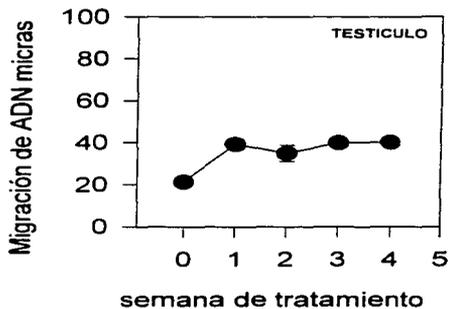
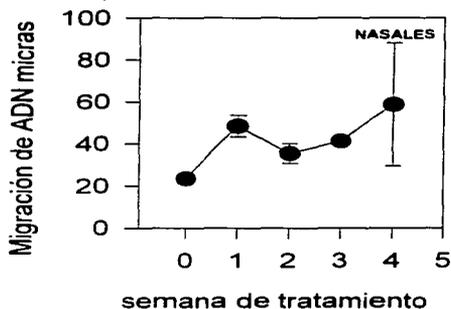
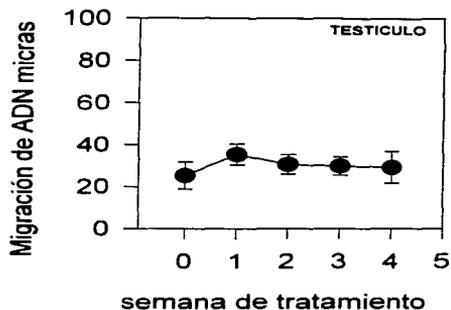
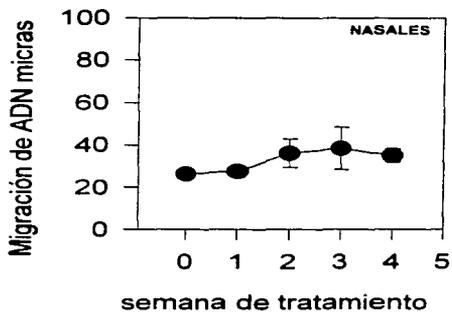
Gráfica 1.- Genotoxicidad inducida en riñón e hígado.



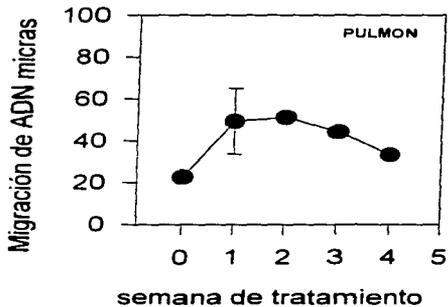
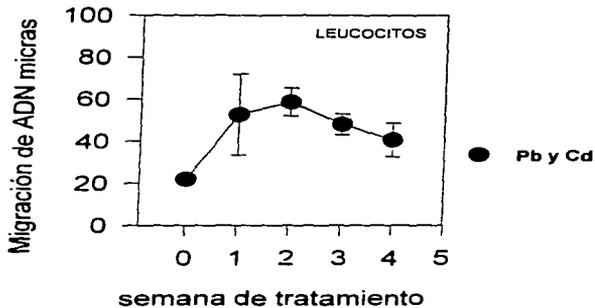
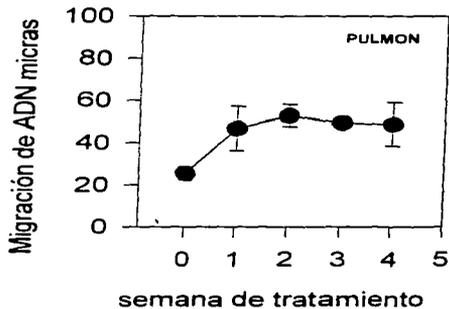
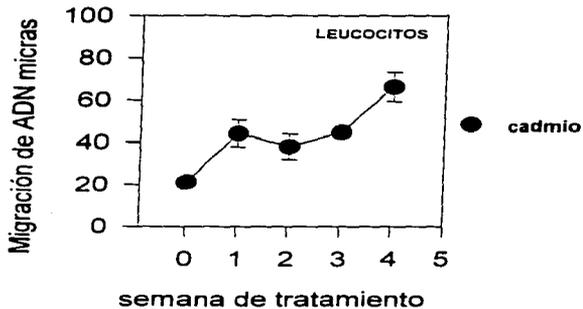
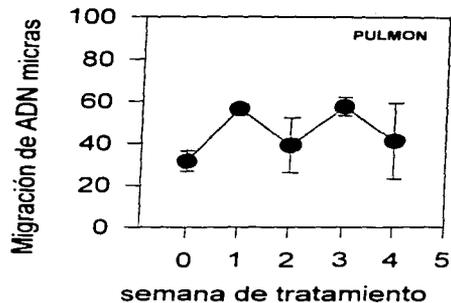
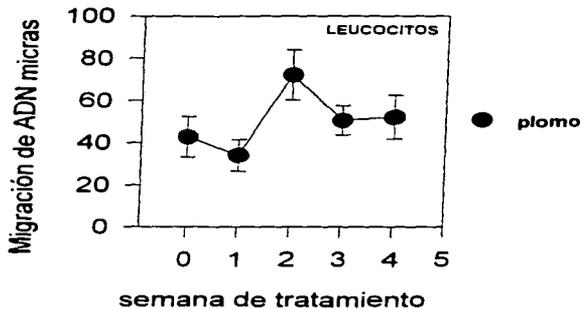
Gráfica 2.- Genotoxicidad inducida en cerebro y médula.



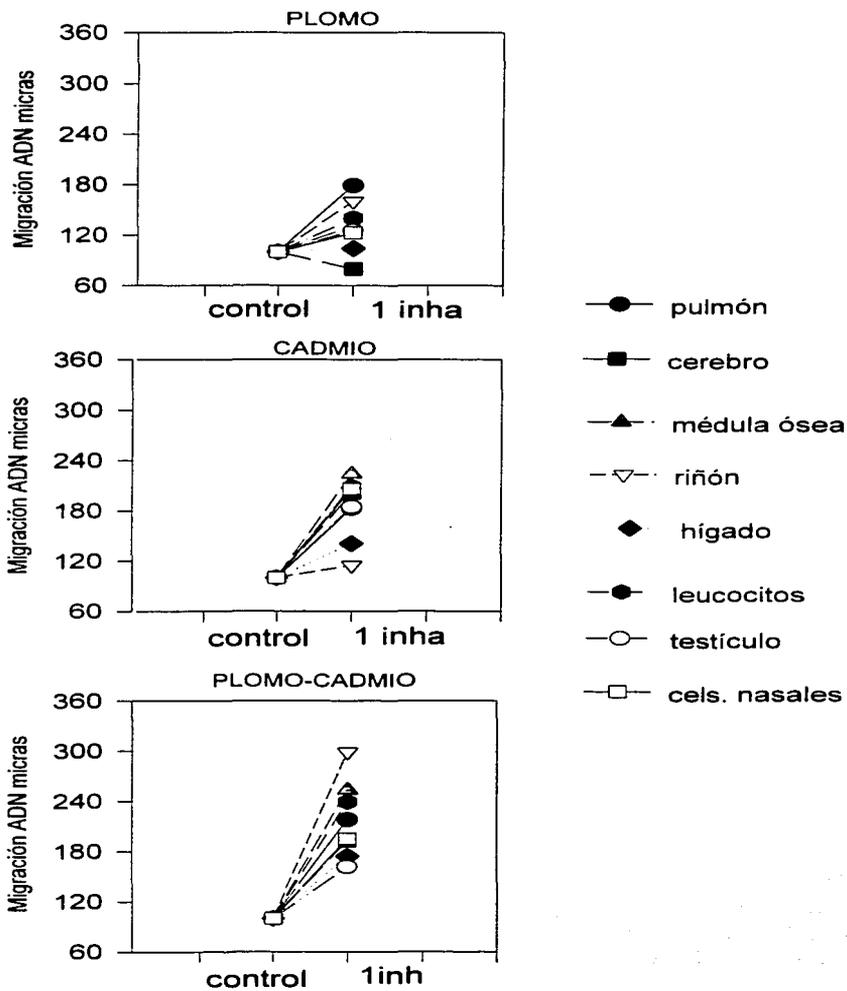
Gráfica 3.- Genotoxicidad inducida en células nasales y testículo.



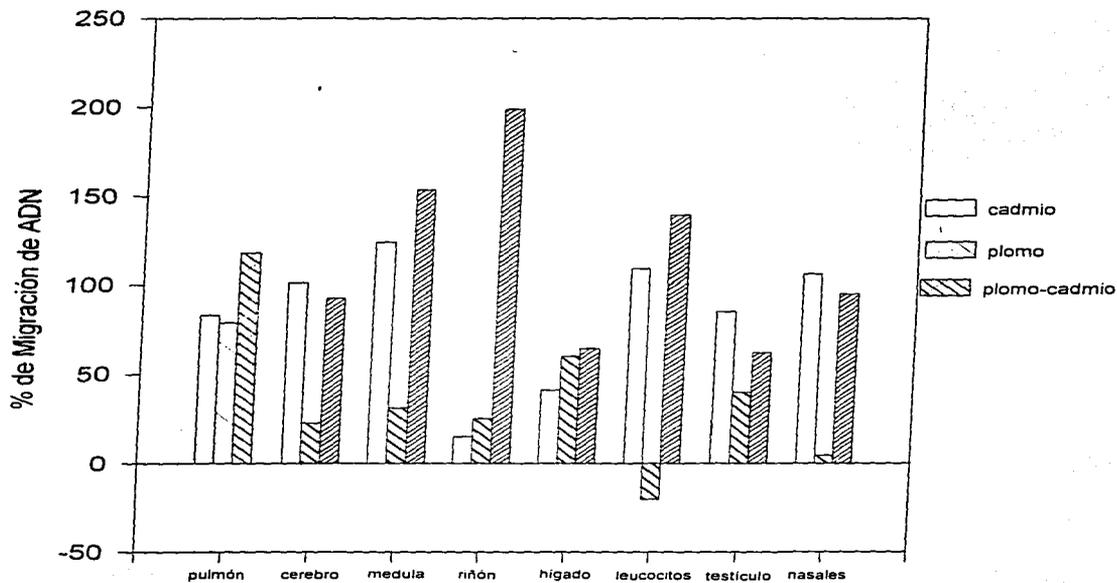
Gráfica 4.- Genotoxicidad inducida en leucocitos y pulmón.



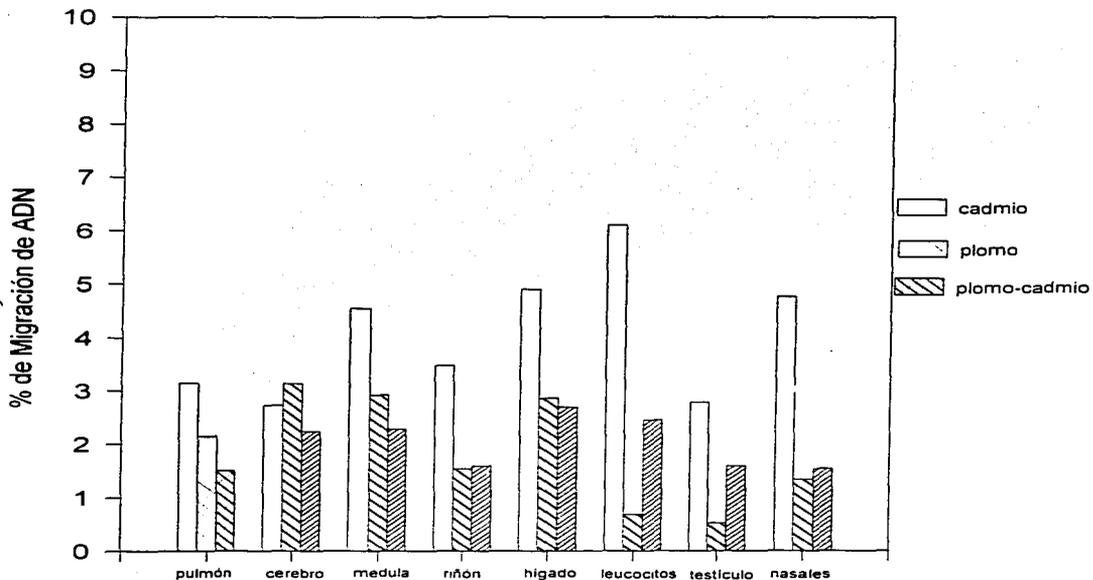
Gráfica 5.- Migración de ADN debido a la inhalación aguda de cadmio, plomo y plomo-cadmio.



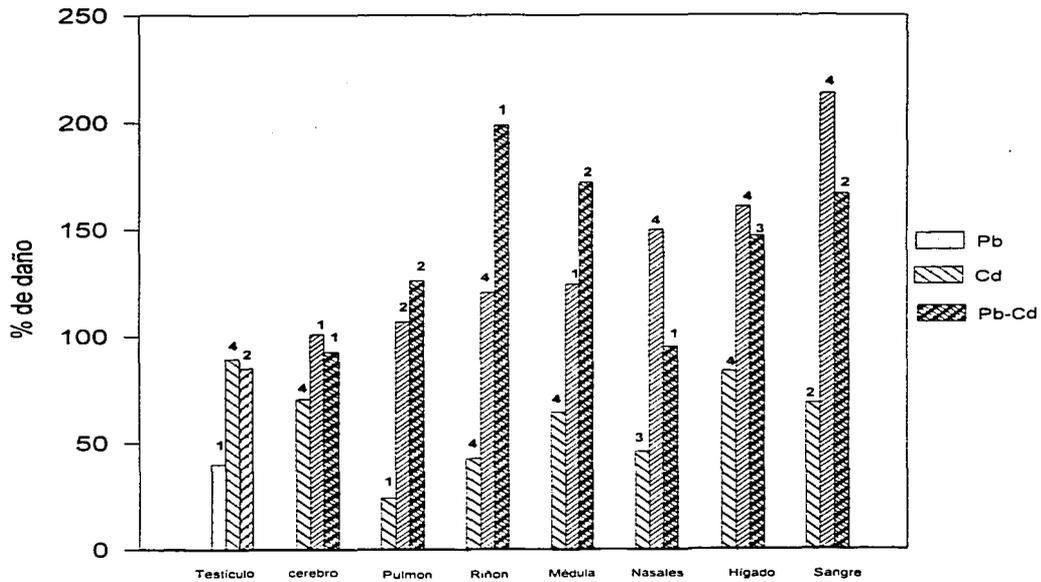
Gráfica 6.- Inducción de daño al ADN en diferentes órganos de ratón por la inhalación de plomo, cadmio y plomo-cadmio (Tratamiento Agudo).



Gráfica 7.- Inducción de daño al ADN en diferentes órganos de ratón por la inhalación de plomo, cadmio y plomo-cadmio (Tratamiento subcrónico).

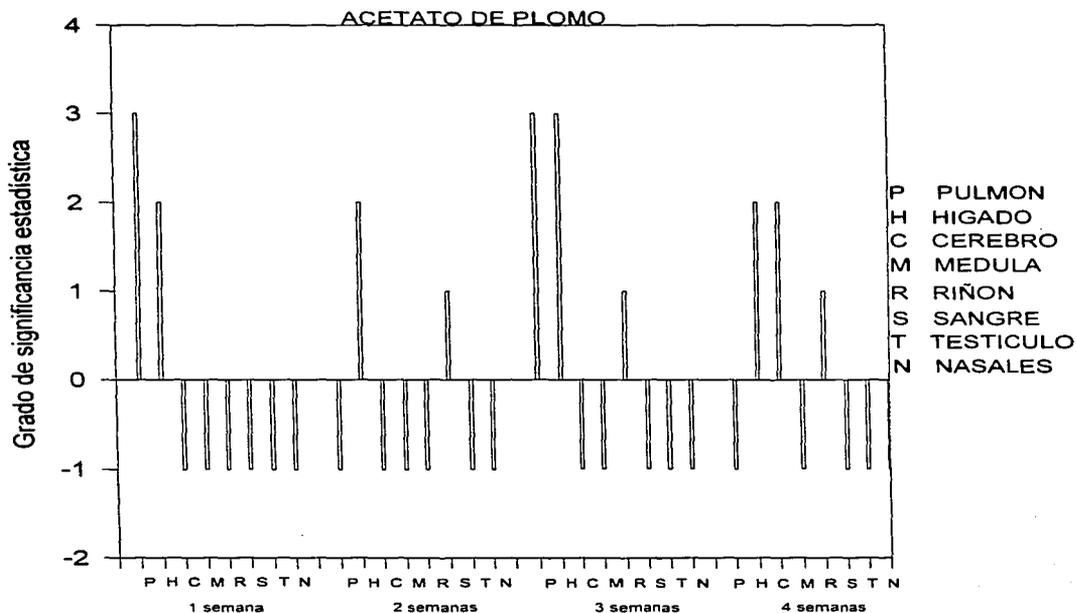


Gráfica 8.- Porcentaje de daño al ADN en diferentes órganos de ratón por la inhalación de plomo, cadmio y plomo-cadmio.



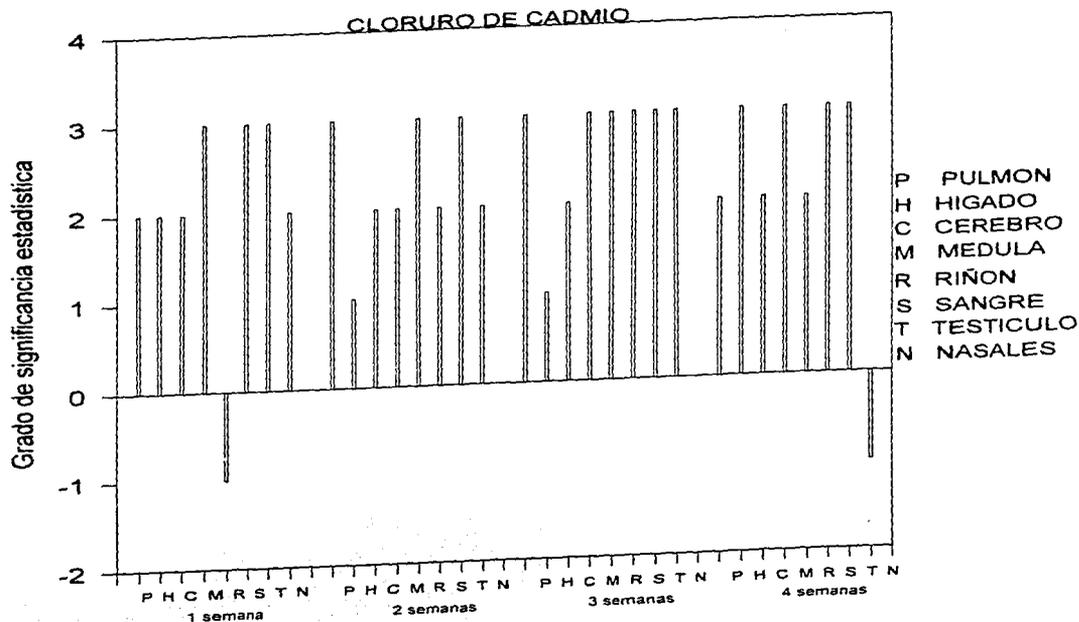
1-4: semana de exposición con mas daño

Gráfica 9A.- Grado de significancia estadística de la inducción de daño al ADN.



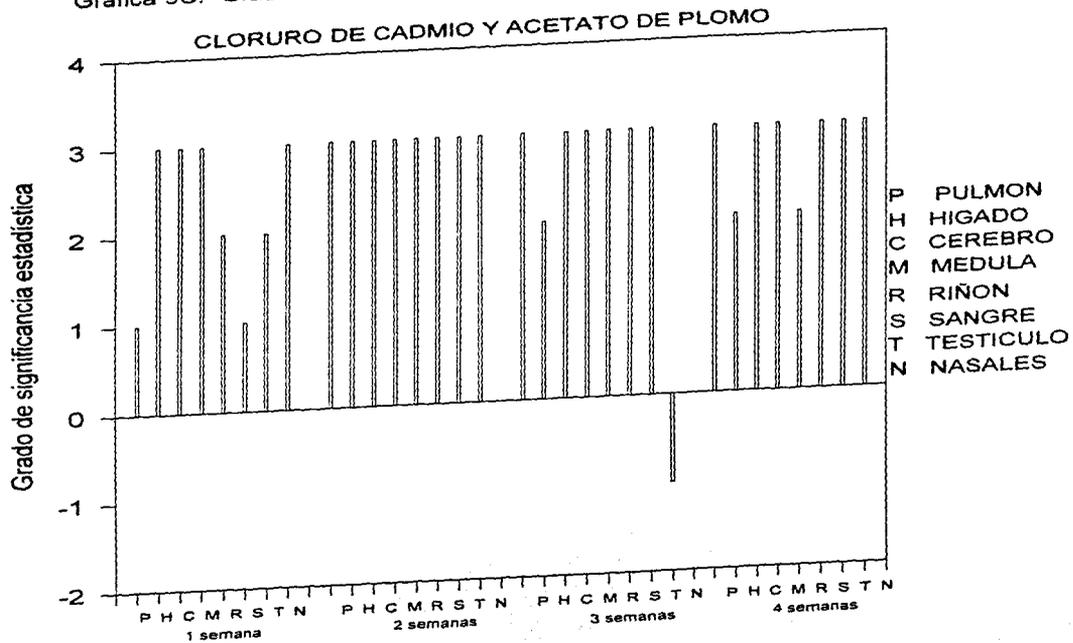
-1= NO SIGNIFICATIVO; 1= SIGNIFICATIVO; 2= MUY SIGNIFICATIVO; 3= EXTREMADAMENTE SIGNIFICATIVO

Gráfica 9B.- Grado de significancia estadística de la inducción de daño al ADN

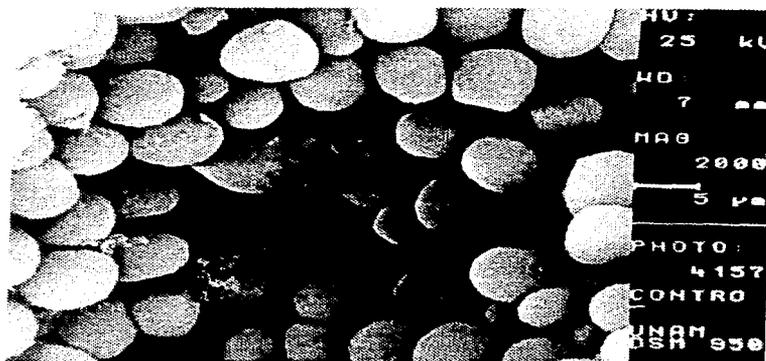


-1= NO SIGNIFICATIVO; 1= SIGNIFICATIVO; 2= MUY SIGNIFICATIVO; 3= EXTREMADAMENTE SIGNIFICATIVO

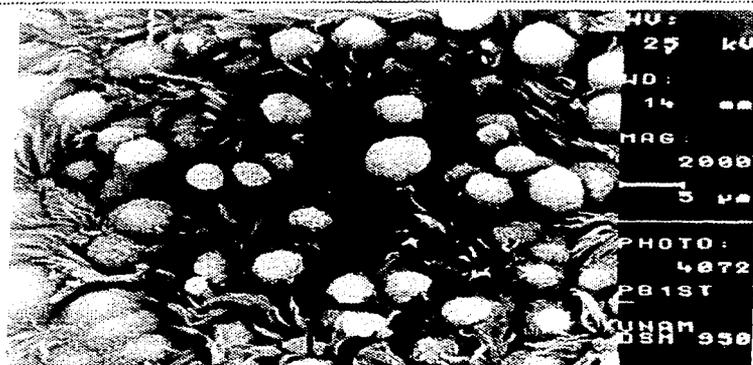
Gráfica 9C.- Grado de significancia estadística de la inducción de daño al ADN.



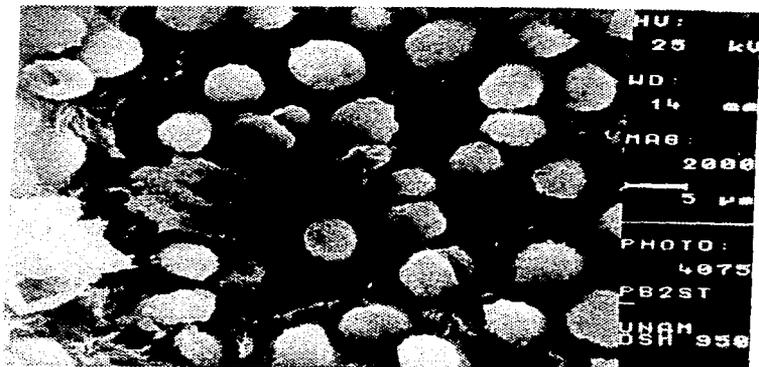
-1= NO SIGNIFICATIVO; 1= SIGNIFICATIVO; 2= MUY SIGNIFICATIVO; 3= EXTREMADAMENTE SIGNIFICATIVO



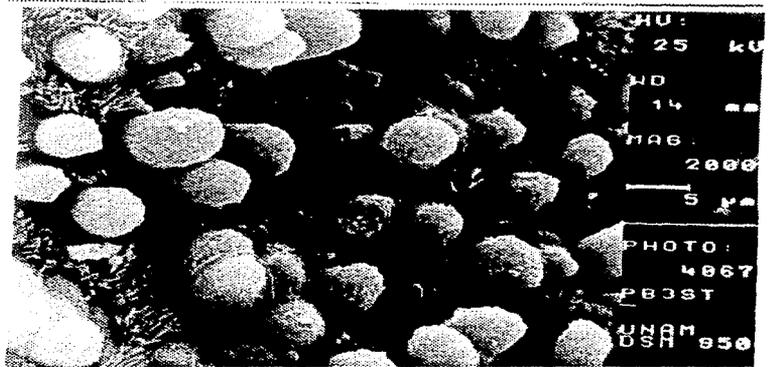
Fotografía 1.- Micrografía de barrido (2000X) correspondiente a bronquiolo (Células de Clara) de raton CD-1 control.



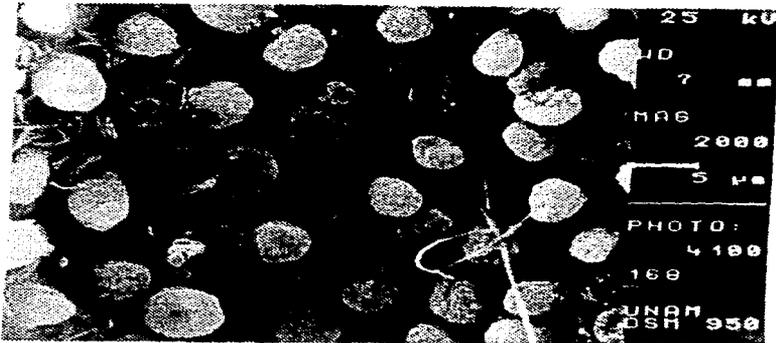
Fotografía 2.- Microscopia de barrido (2000x) correspondiente a bronquiolo (Células de Clara) de raton CD-1 despues de una semana de tratamiento con acetato de plomo.



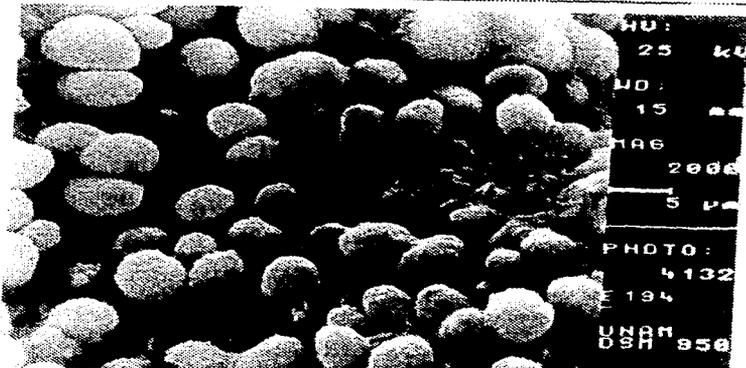
Fotografía 3.- Microscopia de barrido (2000x) correspondiente a bronquiolo (Células de Clara) de ratón CD-1 después de dos semanas de tratamiento con acetato de plomo.



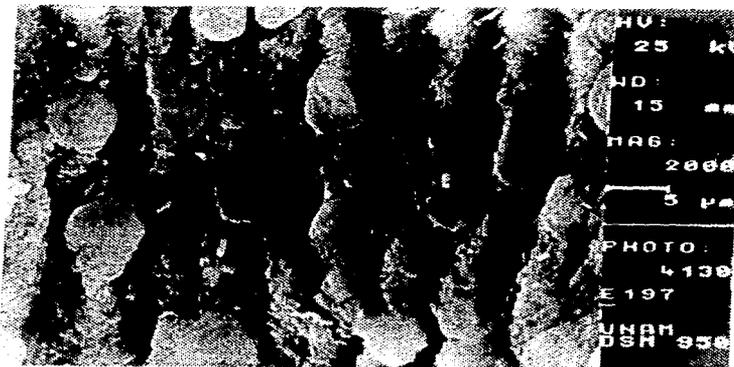
Fotografía 4.- Microscopia de barrido (2000x) correspondiente a bronquiolo (Células de Clara) de ratón CD-1 después de tres semanas de tratamiento con acetato de plomo.



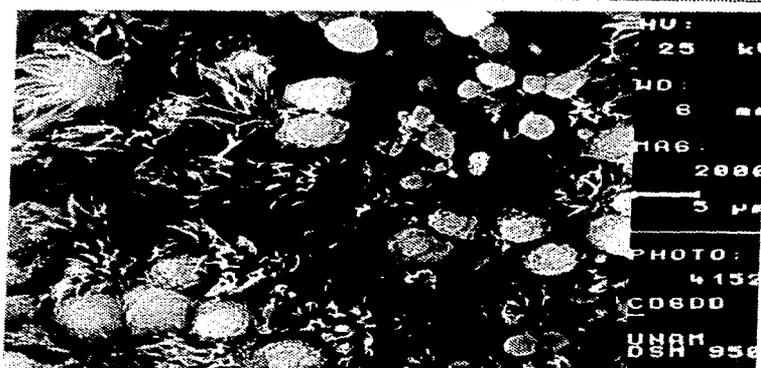
Fotografía 5.- Microscopia de barrido (2000x) correspondiente a bronquiolo (Células de Clara) de ratón CD-1 después de cuatro semanas de tratamiento con acetato de plomo.



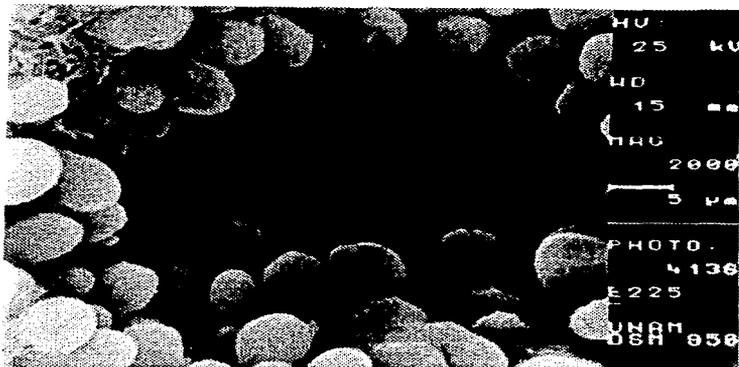
Fotografía 6.- Microscopia de barrido (2000x) correspondiente a bronquiolo (Células de Clara) de ratón CD-1 después de una semana de tratamiento con cloruro de cadmio.



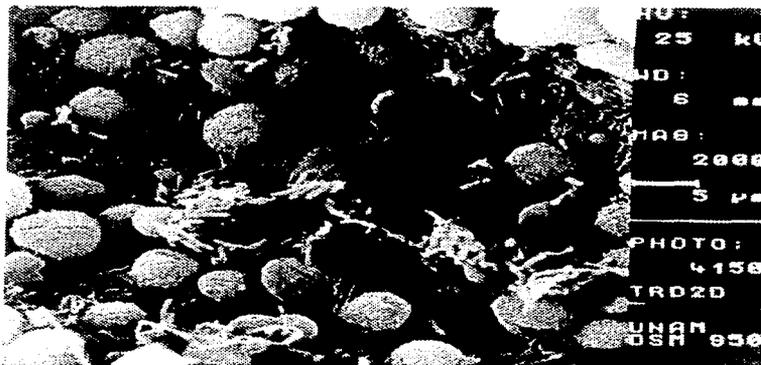
Fotografía 7.- Microscopia de barrido (2000x) correspondiente a bronquiolo (Células de Clara) de ratón CD-1 después de dos semanas de tratamiento con cloruro de cadmio.



Fotografía 8.- Microscopia de barrido (2000x) correspondiente a bronquiolo (Células de Clara) de ratón CD-1 después de tres semanas de tratamiento con cloruro de cadmio.



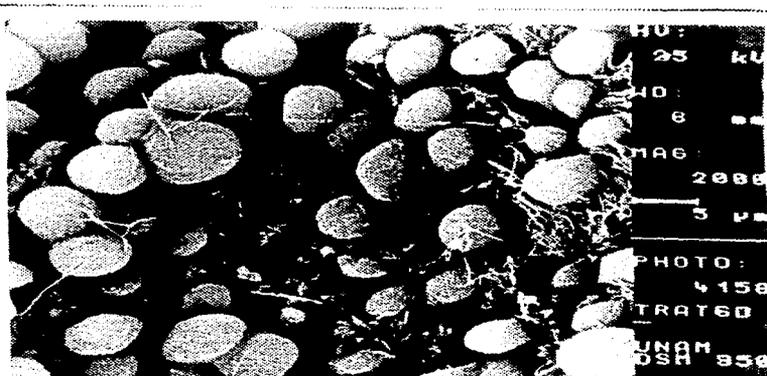
Fotografía 9.- Microscopía de barrido (2000x) correspondiente a bronquiolo (Células de Clara) de ratón CD-1 después de cuatro semanas de tratamiento con cloruro de cadmio.



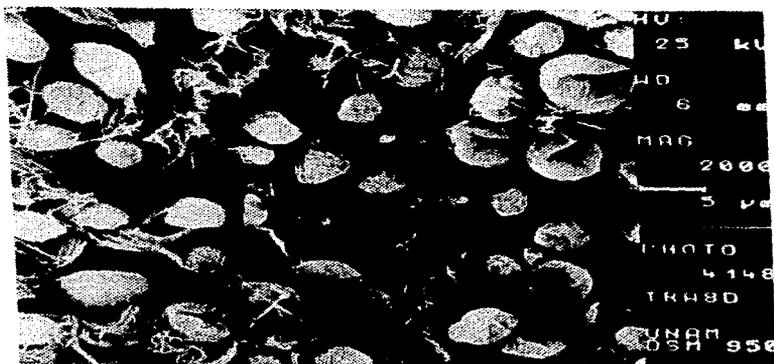
Fotografía 10.- Microscopía de barrido (2000x) correspondiente a bronquiolo (Células de Clara) de ratón CD-1 después de una semana de tratamiento con acetato de plomo y cloruro de cadmio.



Fotografía 11.- Microscopia de barrido (2000x) correspondiente a bronquiolo (Células de Clara) de ratón CD-1 después de dos semanas de tratamiento con acetato de plomo y cloruro de cadmio.



Fotografía 12.- Microscopia de barrido (2000x) correspondiente a bronquiolo (Células de Clara) de ratón CD-1 después de tres semanas de tratamiento con acetato de plomo y cloruro de cadmio.



Fotografía 13.- Microscopia de barrido (2000x) correspondiente a bronquiolo (Células de Clara) de ratón CD-1 después de cuatro semanas de tratamiento con acetato de plomo y cloruro de cadmio.