

11281

19

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EFFECTOS NEUROTÓXICOS DEL PLOMO Y SU RELACIÓN CON LA  
ACTIVIDAD DE LA SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO EN  
ROEDORES ADULTOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

M. en C. GUADALUPE GARCÍA ARENAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. L. CAMILO RIOS CASTAÑEDA

MEXICO. D. F

2002.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

GARCIA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## ABREVIATURAS

Pb..... plomo  
BHE.... barrera hematoencefálica  
ON .... óxido nítrico  
LTD.... Depresión a largo plazo  
LTP.... Potenciación a largo plazo  
SON.... Sintasa del óxido nítrico  
NADPH.. Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
FAD.... Flavín adenín dinucleótido  
FMN.... Flavín mononucleótido  
CSON... Sintasa del óxido nítrico constitutiva  
ISON... Sintasa del óxido nítrico inducible  
NSON... Sintasa del óxido nítrico neuronal  
ESON... Sintasa del óxido nítrico endotelial  
NMDA... N-metil-D-aspartato  
nSON<sup>-</sup>.. Mutación de la isoforma nSON  
eSON<sup>-</sup>.. Mutación de la isoforma eSON  
L-NAME N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil ester  
GD.... Giro Dentado  
PP .... Vía perforante  
EPSP.. Potenciales postsinápticos excitatorios  
IQ ... Coeficiente intelectual

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INDICE

Resumen .....	I
Abstract .....	II
1. Primera Fase.....	1
Antecedentes.....	1
Generalidades del plomo.....	1
El Oxido nítrico (ON).....	5
Síntesis del ON.....	6
Relación del plomo sobre el ON.....	9
Hipótesis.....	10
Objetivo.....	11
Métodos.....	11
Animales.....	11
Aislamiento de sinaptosomas y capilares.....	11
Análisis de plomo en fracciones cerebrales y sangre.....	13
Actividad de la sintasa del óxido nítrico (SON).....	14
Análisis estadístico.....	16
Resultados.....	16
Discusión.....	25
2. Segunda Fase.....	28
Hipótesis.....	28
Objetivo.....	28
Métodos.....	29
Animales.....	29
Análisis estadístico.....	31
Resultados.....	31
Discusión.....	35
3. Tercera Fase.....	41

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Antecedentes.....	41
Potenciación a largo plazo (LTP).....	41
Efecto del plomo sobre la LTP .....	43
Participación del óxido nítrico en la LTP .....	45
Hipótesis.....	47
Objetivo.....	47
Métodos.....	48
Animales.....	48
Resultados.....	51
Discusión.....	53
4. Cuarta Fase.....	56
Antecedentes.....	56
Neurotoxicidad del Plomo.....	56
Hipótesis.....	60
Objetivo.....	60
Métodos.....	60
Pruebas Cognitivas.....	60
Laberinto de agua.....	60
Prevención Pasiva.....	62
Actividad Motora.....	63
Resultados.....	63
Discusión.....	70
Conclusión General.....	72
Referencias.....	79

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## Resumen

El plomo es un tóxico, principalmente a nivel del sistema nervioso central. La mayoría de los estudios se han realizado en animales expuestos a plomo en edades tempranas, sin determinarse con exactitud sus efectos en animales adultos. En la primera fase se determinó que la exposición a plomo en ratones machos adultos expuestos durante 14 días, se logran concentraciones de plomo en capilares y sinaptosomas de cerebro que alteran la actividad de la sintasa del óxido nítrico (SON). En una segunda fase se observó que la actividad de la SON constitutiva se inhibió significativamente con 125, 250 y 500 ppm de Pb en sinaptosomas de hipocampo y cerebelo, mientras que en la corteza frontal y tallo no hubo cambios significativos. Observamos una inhibición de la LTP hipocampal *in vivo*, con un bloqueo total con las dosis de 250 y 500 ppm. Se emplearon las pruebas de laberinto en agua y prevención pasiva y observamos que la adquisición de estas pruebas no se afectó, sin embargo, con la dosis de 250 y 500 ppm la consolidación de la memoria espacial se afectó, mientras que en la segunda prueba, se alteró la memoria sólo con la dosis más alta. Estos resultados indican que el Pb se deposita en las regiones del cerebro de animales adultos, provocando cambios en la actividad de la SON sólo en algunas regiones específicas, por lo que se sigue que este mecanismo antecede a las alteraciones en la formación de la memoria en los animales expuestos.

## Abstract

The primary target of lead is the nervous system. Most studies dealing with the effects of lead on the nervous system have been done in young animals exposed at early ages, and its effects in adult life are uncertain. For the first step of this thesis lead concentrations in capillaries and brain sinaptosomes that altered the activity of the nitric oxide synthase (NOS) were obtained in adult male mice exposed during 14 days. In the second step constitutive NOS was significantly decreased with 125, 250, 500 ppm lead in hippocampus and cerebellum sinaptosomes, while there were no significant changes in the frontal cortex and brain stem. We observed an inhibition of hippocampal long-term potentials (LTP) *in vivo*, with total blockage with 250 and 500 ppm of lead. In this study we employed the water maze and passive avoidance tests; no significant differences in the acquisition were seen. However, there was a deficit in the memory for the water maze performance with the 250-ppm and 500-ppm dosages, while only the 500-ppm dose produced this deficit in the passive avoidance test. Our data indicate that lead is stored in these four brain regions of adult animals and produces changes in the NOS activity in specific regions. This mechanism may be a previous event to cognitive impairment in the exposed animals.

## 1. PRIMERA FASE

### ANTECEDENTES

#### Generalidades del Plomo

El plomo (Pb) es un metal pesado divalente que se encuentra extensamente distribuido en la corteza terrestre. Las propiedades físico-químicas de este elemento lo hacen útil en la elaboración de una gran cantidad de productos, por lo que ha sido uno de los metales más empleados a lo largo de la Historia (Hernández-Avila y Palazuelos, 1995).

Aunque se han discutido los efectos nocivos del plomo en la salud desde hace muchos años, en la actualidad el uso continuo de este metal sigue generando importantes problemas tanto en la salud pública como en el ámbito ocupacional (Payton et al., 1998).

Actualmente, las emisiones de los vehículos automotores en países que usan gasolina con plomo, las industrias fundidoras, las recicladoras de baterías, y los pigmentos para pinturas, son algunas de las fuentes que más contribuyen a la contaminación ambiental por plomo (Matte et al., 1994).



Particularmente en México, una importante fuente de exposición al metal es la loza de barro vidriado que comúnmente se utiliza sobre todo en el medio rural. Como esta loza tradicional es barnizada y endurecida en hornos a bajas temperaturas, no se consigue una unión permanente del barniz a base de plomo. Como consecuencia, el plomo es liberado durante la cocción y el almacenamiento de alimentos y bebidas (Rojas-López et al., 1994). El amplio uso de este metal ocasiona la incorporación ubicua de este tóxico en el suelo, aire, alimentos y agua superficial, aumentando por lo mismo la exposición de la población en general.

En los últimos años se han realizado un número importante de investigaciones relacionadas con los efectos que en la salud ha tenido la exposición a plomo en niños y en animales en desarrollo. Los resultados de estos estudios muestran que los niveles de plomo sanguíneo, que se habían considerado seguros en la población infantil, han disminuido a lo largo de las tres últimas décadas, pasando de 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , a los 10  $\mu\text{g}/\text{dl}$  que es la norma que rige actualmente en Estados Unidos de América (American Academy Pediatrics Comitee on Environmental Health, 1991) y en nuestro país.

La exposición a plomo en individuos no expuestos ocupacionalmente proviene de la ingesta de residuos en el

agua, los alimentos y la inhalación de polvos y vapores (Rice, 1995). Los pulmones absorben mejor el plomo que el tracto gastrointestinal. Este último capta entre un 30 y 50% en niños y un 5 al 15% en adultos (Gross et al., 1975; Al Dhaheri et al., 1995). Sin embargo, se comprobó que la vía más frecuente de intoxicación es la ingestión, aunque el porcentaje de absorción va a depender en gran medida del estado nutricional del individuo, siendo mayor si la dieta es pobre en calcio, hierro y/o proteínas (Palminger et al., 1996).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El 95% del plomo absorbido se une a los eritrocitos, teniendo una vida media en sangre de 28 a 35 días en los seres humanos. El plomo se distribuye en todos los órganos y tejidos, acumulándose preferentemente en los huesos, que se convierten en un sitio de almacén durante la exposición crónica a este metal (Payton et al., 1998). Otros sitios de almacenamiento del plomo son el hígado, los riñones, los músculos y el cerebro, ocasionando frecuentemente alteraciones en ellos. En el cerebro se alcanzan concentraciones similares a las de la sangre, con una distribución irregular en sus diversas regiones (Cory-Slechta, 1995). Estas concentraciones permanecen altas, aun

cuando los niveles en la sangre se reduzcan (Smith et al., 1995).

El plomo se elimina a través de las heces, la orina y por secreciones como la leche materna (Palminger, 1996), la cual se convierte al mismo tiempo en una fuente importante de exposición a Pb en lactantes.

Los efectos adversos por la exposición a plomo se manifiestan en los sistemas reproductor, hematopoyético, renal, y en el sistema nervioso central que es uno de los sitios en donde se producen las manifestaciones más importantes de su toxicidad (Silbergeld, 1992; Goyer, 1993).

Es importante mencionar que la mayoría de las investigaciones se ha realizado principalmente con exposiciones iniciadas en las etapas tempranas y por períodos prolongados de exposición (exposición crónica). El argumento en el cual se apoyan estos estudios se basa en que el plomo puede cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE) inmadura en estas etapas de desarrollo. Sin embargo, no se han establecido el tiempo y los niveles necesarios de exposición al plomo para que éste pase la barrera encefálica en la población adulta, en la cual

se encuentra ya madura, y cause alteraciones en el sistema nervioso central.

Por lo tanto, uno de los objetivos del trabajo que realizamos fue el de determinar los niveles de exposición causantes de alteraciones bioquímicas en animales adultos, enfocando nuestro interés en la producción del óxido nítrico en el cerebro.

### El Óxido Nítrico (ON)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El Oxido Nítrico (ON) es un mensajero biológico con múltiples funciones en los vertebrados. En el cerebro humano es mediador de la vasodilatación y la neurotransmisión. Es, además, la sustancia responsable de la acción antimicrobial de los macrófagos, siendo neurotóxico cuando se produce en exceso (Forsterman et al., 1991; Garthwait, 1991). Evidencias recientes sugieren que el ON interviene como mensajero retrógrado (Huang, 1997; Hawkins et al., 1998) en procesos de plasticidad sináptica en el cerebelo, donde se le asocia con el fenómeno de depresión a Largo Plazo (LTD, por sus siglas en inglés) en las células de Purkinje (Ito, 1989), así como en el hipocampo, donde participa en la potenciación a Largo Plazo (LTP, por sus siglas en inglés).

El óxido nítrico es un gas reactivo con una vida media de pocos segundos; es también un neurotransmisor que no se almacena en vesículas sinápticas, ni es liberado por exocitosis, sino que se difunde a través de la membrana celular (Arancio et al., 1996; Jaffrey y Snyder, 1995; Nilsson y Soderstrom, 1997). En el sistema nervioso central, el ON actúa como un mensajero intercelular que difunde rápidamente hacia las células blanco, logrando difundir de 0.3 a 0.4 mm, aproximadamente (Prast y Philippu, 2001).

### **Síntesis del ON**

Existen tres clases de sintetasas del óxido nítrico (SON) que son las enzimas que sintetizan al mensajero. Producen ON y L-citrulina en forma estequiométrica, a partir de L-arginina como su sustrato. Para esta reacción se requieren diferentes cofactores: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), como donador de un electrón, y flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN) y tetrahidrobiopterina. Es importante mencionar que en este proceso se utiliza una molécula de  $O_2$  (Bredt y Snyder, 1992; Moncada et al., 1989; Nilsson y Solderstrom, 1997).

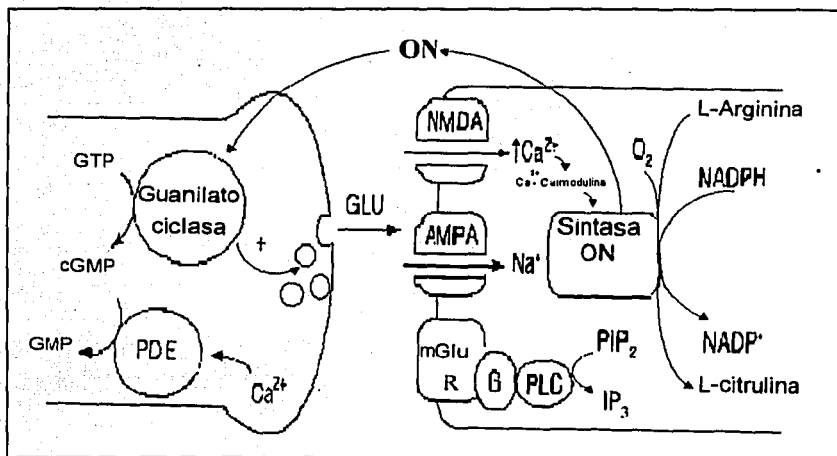
Existen dos categorías de isoenzimas de la SON: la constitutiva (SONc) y la inducible (SONi). La constitutiva se encuentra en las células endoteliales, neuronas y plaquetas, y es regulada por la unión del calcio a la calmodulina. Este tipo de enzima produce cantidades pequeñas de ON por un período corto de tiempo. En esta clase existen dos isoformas: la SON neuronal (SONn) que se encuentra en neuronas y la SON endotelial (SONe), que se encuentra tanto en neuronas como en células endoteliales. En cuanto a su diferencia, SONn es citosólica y la SONE está asociada a membrana (Nilsson y Solderstrom, 1997; Holscher, 1997).

El tipo inducible de la SON (SONi), que se encuentra primordialmente en células gliales, células endoteliales y macrófagos, es independiente de las concentraciones de calcio (Stuehr et al., 1991; Ignarro, 1991). Su inducción y activación, que ocurre como respuesta a endotoxinas y citocinas, son procesos que requieren de la transcripción de DNA y de la síntesis de proteínas, produciendo niveles elevados de ON por un largo período de tiempo. Las tres isoformas son codificadas por diferentes genes, y muestran una homología del 50% (Nilsson y Solderstrom, 1997).

La síntesis del ON por las enzimas constitutivas es estimulada por el aumento en las concentraciones de calcio

intracelular, provocada por la activación de receptores de glutamato, preferentemente del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). El ON difunde a través de la membrana postsináptica y cruza el espacio sináptico, donde activa a la guanilato ciclasa soluble en la neurona presináptica, e induce la formación de cGMP en la terminal presináptica, modulando con ello la función celular (Arancio et al., 1996) (Esquema 1).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Esquema 1.** Esquema representativo de los mecanismos de acción donde interviene el óxido nítrico en la potenciación a largo plazo (Holcher, 1997).

## Relación del Plomo con el ON.

Estudios realizados por Blazka y cols. (1994), mostraron una inhibición en la producción de nitritos (metabolitos del ON) en cultivo de células endoteliales cerebrales expuestas a concentraciones de 10 a 1000 nM de acetato de plomo. Así también, Quinn y Harris (1995) reportaron que en homogenados de cerebelo la actividad de la SON fue inhibida de forma dosis-dependiente con concentraciones de plomo libre de 17 a 80 nM. Los mismos autores reportaron que esta inhibición fue revertida al aumentar las concentraciones de calcio libre del medio.

Muchos de los efectos neurotóxicos del plomo se relacionan con la capacidad del metal para unirse a los sitios de unión con calcio y mimetizar, o en algunos casos inhibir, la acción del calcio en los procesos celulares (Bressler y Goldstein, 1991; Sandhir y Gill, 1994). De tal modo que los efectos inhibitorios del plomo sobre la SON constitutiva se relacionan con la posible sustitución del metal en el sitio de calcio del complejo calcio-calmodulina.

De acuerdo con los antecedentes mencionados anteriormente, propusimos que en los animales expuestos, el plomo podría



intervenir en la actividad de la SON de sinaptosomas y capilares de los animales expuestos. Sin embargo, para poder conocerlo resultaba de primordial importancia saber si la exposición en la etapa adulta, con una BHE madura, impide o no que el plomo se deposite en estas fracciones cerebrales al encontrarse bien definida la permeabilidad de la BHE. En vista de la situación, el interés de esta fase de estudio fue el de determinar si con una exposición de tiempo corto (exposición subaguda), el plomo llegaría al cerebro y así conocer el umbral de efecto para intervenir en procesos bioquímicos en condiciones de exposición con las que se logran concentraciones sanguíneas de plomo que se presentan en la población humana.

### **Hipótesis.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La exposición subaguda a plomo en animales adultos es suficiente para obtener concentraciones de este metal en fracciones cerebrales que alteran la actividad de las dos clases de SON.

## **Objetivo.**

Determinar las concentraciones de plomo en capilares y sinaptosomas que puedan alterar procesos bioquímicos, como la actividad de las clases de sintasa del óxido nítrico.

## **Métodos.**

### **Animales**

Como primera fase se usaron ratones macho de la cepa C57BL/6J de 25 a 30 g de peso, divididos en cuatro grupos de exposición a acetato de plomo añadido en el agua de beber, a concentraciones de 0, 250, 500 y 1000 ppm durante 14 días. Los datos representan una n de 6 para cada grupo.

### **Aislamiento de sinaptosomas y capilares.**

Los animales fueron anestesiados con éter etílico y perfundidos los cerebros con solución salina (0.9%) fría, por dos minutos aproximadamente, a través del ventrículo izquierdo de corazón, hasta que la solución al final de la perfusión se observara cristalina. El cerebro fue rápidamente removido, utilizándose el cerebro de dos animales para

obtener la cantidad suficiente de sinaptosomas para los análisis. El tejido cerebral se homogenizó en solución Ringer a pH 7.4 en tubos de vidrio con un homogenizador de teflón. Todo el proceso para la obtención de sinaptosomas se realizó en frío.

Se centrifugó el homogenizado a 4500 rpm durante 15 minutos, almacenando el sobrenadante, y recuperando el volumen con solución Ringer (3 veces). Los sobrenadantes almacenados se centrifugaron a 10 000 rpm durante 20 minutos, quedando en el fondo la pastilla correspondiente a la fracción sinaptosomal cruda.

Para obtener las fracciones capilares se utilizó la pastilla obtenida después de las tres centrifugaciones, resuspendida con una solución de sacarosa 0.25 M , llevando a un gradiente de concentración de sacarosa (1 y 1.3 M) y centrifugada a 55 000 X g durante 35 min. La pastilla obtenida se resuspendió en agua desionizada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Análisis de plomo en fracciones cerebrales y sangre

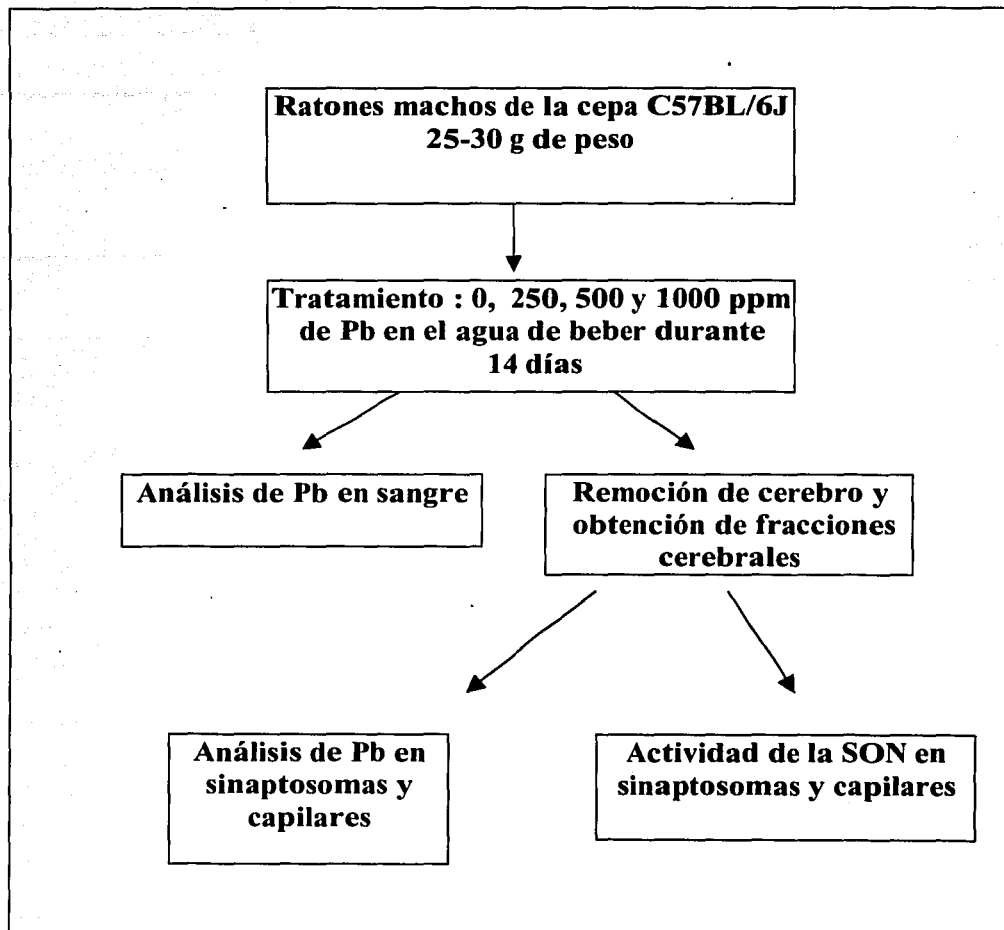
Se analizaron las concentraciones de plomo sanguíneo y sinaptosomal por espectrofotometría de absorción atómica, de acuerdo con la técnica de Miller y colaboradores (1987). Las fracciones cerebrales se disolvieron con  $\text{HNO}_3$  (30%) y se llevaron a baño María (60° C) hasta alcanzar una digestión completa. El análisis de Pb en sangre se determinó después de la precipitación de proteínas de 200  $\mu\text{l}$  de sangre, más 800  $\mu\text{l}$  de  $\text{HNO}_3$  (30%). Posterior a la centrifugación durante 15 min a 15000 rpm, se colocaron en el carrusel del automuestreador (AS-60 de Perkin-Elmer) los sobrenadantes de las muestras y se inyectaron automáticamente 20  $\mu\text{l}$  al espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer modelo HGA-600) con horno de grafito para su análisis. Se realizaron curvas de calibración y usamos como control de calidad estándares externos de referencia de sangre de bovino al iniciar y terminar cada corrida diaria.

## Actividad de la sintasa del óxido nítrico (SON).

La medición de la actividad de la SON se basó en la conversión bioquímica de  $^3\text{H-L-arginina}$  a  $^3\text{H-L-citrulina}$  (Bredt et al., 1990 ; Pérez-Severiano et al., 1998).

El tejido cerebral se homogenizó en 250  $\mu\text{l}$  de una mezcla de inhibidores de proteasas, en un homogenizador con brazo de teflón. Al homogenizado se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Se hizo reaccionar 500  $\mu\text{g}$  de proteína con L-arginina,  $^3\text{H-L-arginina}$ , beta-NADPH,  $\text{CaCl}_2$  y calmodulina durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Después se pasó el contenido de la reacción a través de una columna de intercambio iónico Dowex 50W para separar la  $^3\text{H-L-arginina}$  de la  $^3\text{H-L-citrulina}$ . Finalmente se recolectó el eluyente y se le agregaron 5 ml de líquido de centelleo para medir la radiactividad emitida por la  $^3\text{H-L-citrulina}$  producida por la SON. La actividad de la SON se expresó como ng L-citrulina/mg de proteína/30 minutos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Esquema 1. Diagrama de flujo del diseño experimental.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Análisis estadístico

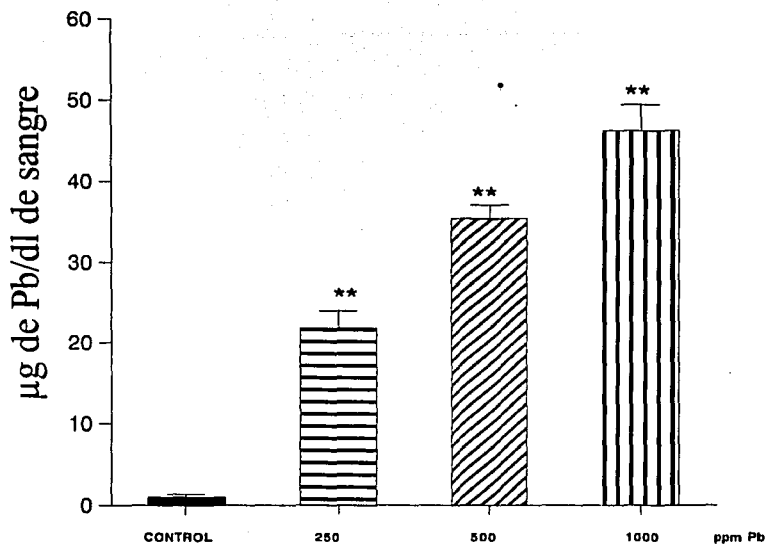
Los valores obtenidos en cada parte experimental fueron sometidos a la prueba estadística de análisis de varianza, seguido de la prueba de Tukey. Se consideró diferencia estadística significativa si  $p \leq 0.05$ .

## Resultados

Los niveles de plomo sanguíneo de ratones expuestos se incrementaron de 0.93  $\mu\text{g Pb/dl}$  ( $\pm 0.4$ ) del grupo control a 21.7 ( $\pm 2.2$ ), 35.5 ( $\pm 1.5$ ) y 46.1 ( $\pm 3.2$ )  $\mu\text{g Pb/dl}$  para los grupos expuestos a 250, 500 y 1000 ppm de Pb, respectivamente. Este incremento fue dosis-dependiente y significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) del grupo control (Gráfica 1).

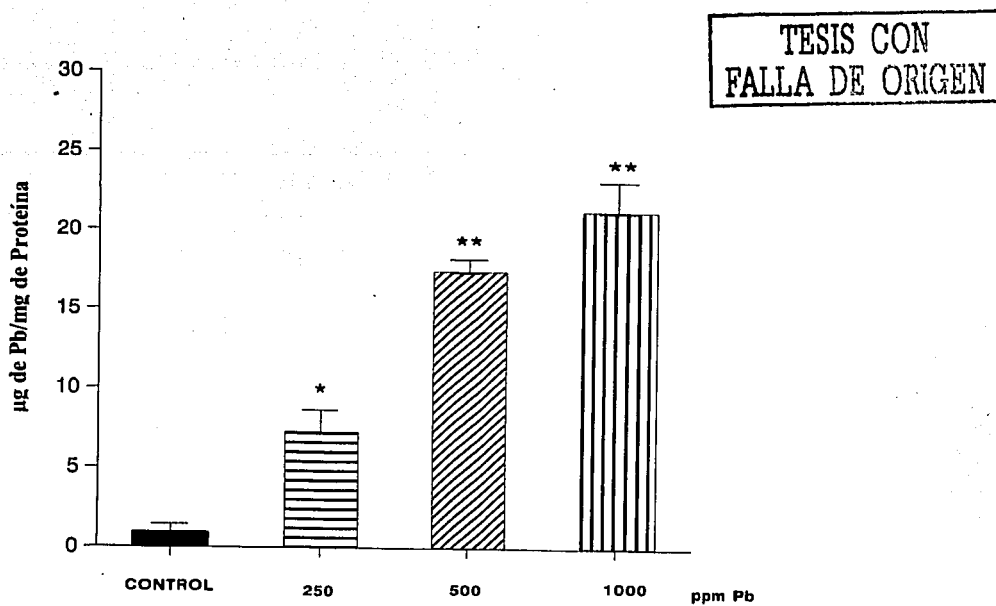
La gráfica 2 muestra las concentraciones de plomo en capilares cerebrales de los ratones con los diferentes tratamientos. Las concentraciones en el grupo control fueron de 1.43 ( $\pm 0.5$ )  $\mu\text{g Pb/mg}$  de proteína y de 8.6 ( $\pm 1.4$ ), 18.2 ( $\pm 0.87$ ) y de 23.08 ( $\pm 1.92$ )  $\mu\text{g Pb/mg}$  de proteína para los grupos tratados con 250, 500 y 1000 ppm de Pb.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Gráfica 1.** Concentraciones de plomo en la sangre de ratones expuestos a diferentes tratamientos. En esta y las subsiguientes gráficas cada barra representa el promedio  $\pm$  error estándar. Diferencia estadística del grupo control; \* \* $p \leq 0.01$ . ANOVA seguida de una prueba de Tukey.



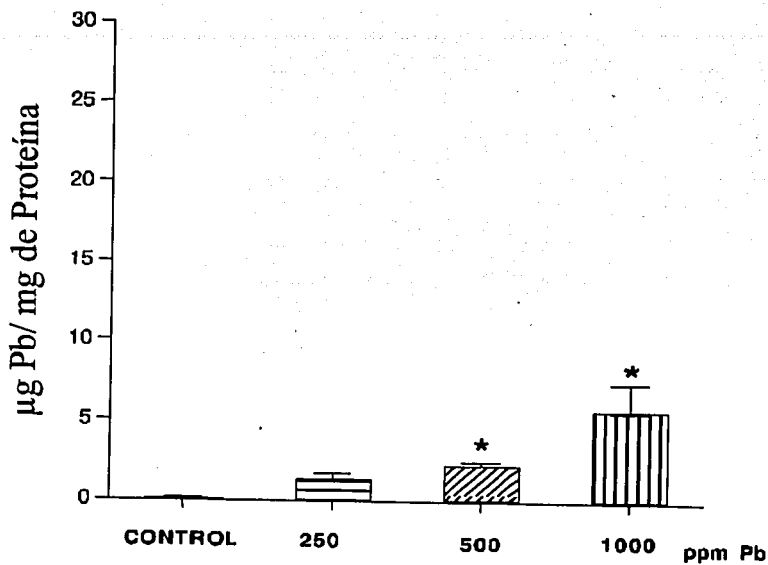


**Gráfica 2.** Concentraciones de plomo en capilares de ratones expuestos con los diferentes tratamientos. Diferencia estadística del grupo control; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ . ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

Para determinar si el diseño experimental realizado inducía un incremento en las concentraciones de plomo de las terminales nerviosas, se cuantificaron las concentraciones de plomo en los sinaptosomas. La concentración de plomo para el grupo control fue de  $0.11 (\pm 0.05) \mu\text{g Pb/mg}$  de proteína y para los grupos tratados con 250 y 500 ppm de Pb aumentó a  $1.69 (\pm 0.36)$ ,  $2.43 (\pm 0.24)$  y  $7.43 (\pm 1.8) \mu\text{g Pb/mg}$  de proteína (Gráfica 3). Con estos datos se puede observar que son más altas las concentraciones de plomo en capilares que en los sinaptosomas.

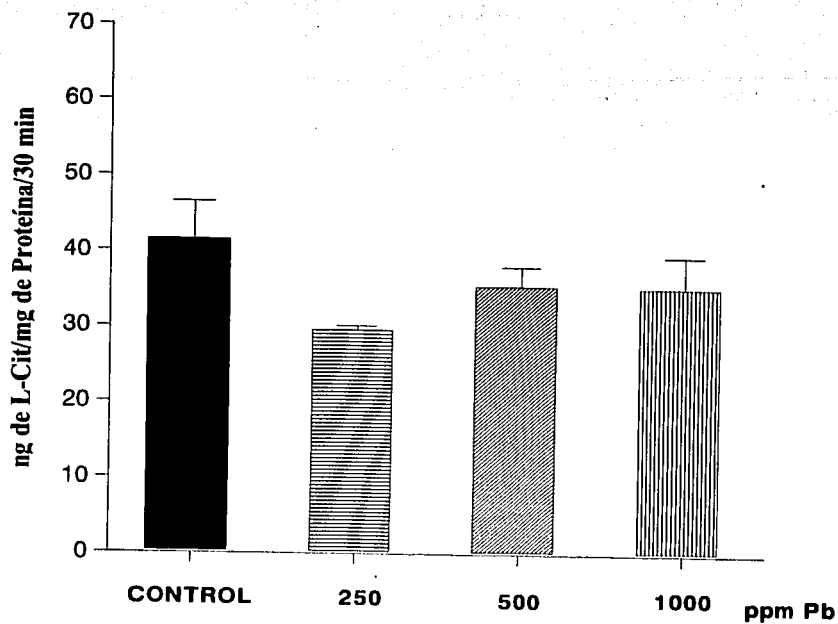
Para determinar un posible efecto de la exposición al plomo se midió la actividad de la SON en cerebro después de cada tratamiento.

La actividad basal en capilares cerebrales de ratones control fue de 40 ng de L-citrulina/mg de proteína/30 min. La gráfica 4 muestra la ausencia de modificaciones en la actividad de la enzima total en los diversos grupos experimentales.



**Gráfica 3.** Concentraciones de plomo en sinaptosomas de ratones expuestos a los diferentes tratamientos de plomo. Diferencia estadística del grupo control; \* $p \leq 0.05$  ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

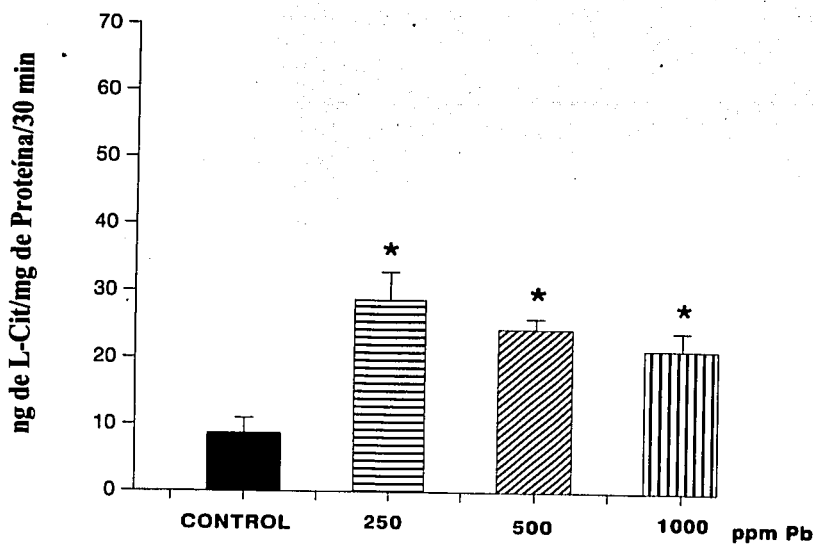


**Gráfica 4.** Actividad de la SON de capilares de ratones expuestos a diferentes dosis de plomo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

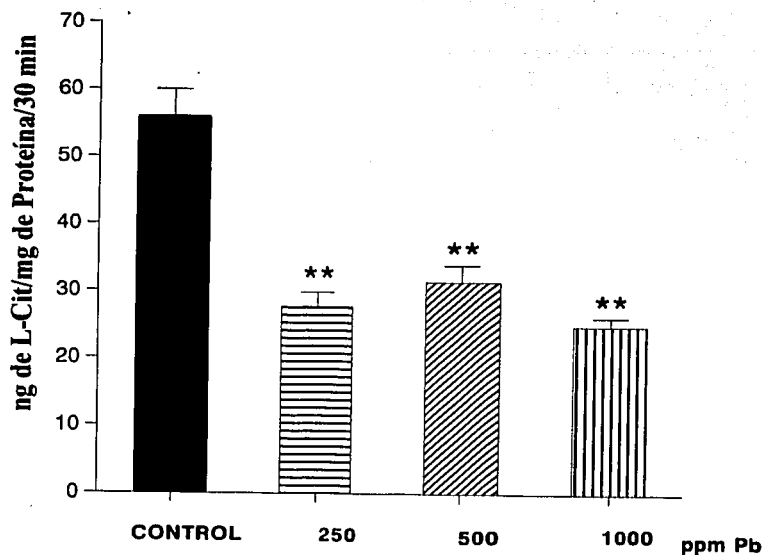
Para evaluar la actividad de la SONi en capilares se redujo totalmente el calcio del medio, empleando EGTA, para eliminar la posibilidad de cuantificar la enzima dependiente de calcio. Los resultados que se observan en la gráfica 5, muestran que la actividad de la SONi se incrementó significativamente en todos los grupos tratados con plomo, en comparación con el grupo control.

En la gráfica 6 se observa la actividad de la SONc en sinaptosomas. En ratones control se observó como valor basal 55 ng de L-citrulina/mg de proteína/30 min, mientras que en sinaptosomas de ratones tratados con plomo la actividad de la SONc se inhibió aproximadamente en un 50% en todos los grupos. Como se observa en la gráfica, la inhibición de la actividad de la SON no fue dosis-dependiente, este comportamiento se observa también en la actividad de la SONi de capilares.



**Gráfica 5.** Actividad de la sintasa del óxido nítrico inducible en capilares de ratones expuestos a los diferentes tratamientos de plomo. Diferencia estadística del grupo control; \* $p \leq 0.05$ . ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Gráfica 6.** Actividad de la sintasa del óxido nítrico constitutiva en sinaptosomas de ratones expuestos a los diferentes tratamientos. Diferencia estadística del grupo control; \* \* $p \leq 0.01$ . ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Discusión.

El objetivo de la primera fase del presente trabajo, consistió en determinar si el uso de dosis bajas de exposición al plomo en animales adultos podrían o no inducir concentraciones del metal significativas en los sinaptosomas. Los resultados permiten determinar que en la edad adulta y con un tratamiento subagudo se logran concentraciones en fracciones cerebrales que alteran los procesos bioquímicos en los sinaptosomas y los capilares.

Con los tratamientos empleados en este estudio se obtuvieron niveles sanguíneos que indican una acumulación preferencial de plomo en capilares, mientras que en sinaptosomas se observa una menor concentración del metal con el mismo diseño experimental. Estos resultados concuerdan con los resultados de estudios que muestran con autorradiografías de capilares aislados una marcada afinidad por el plomo (Needleman, 1992), siendo en las células endoteliales, aparentemente, donde se acumula preferentemente el plomo (Goldstein, 1990). Sin embargo, como lo muestra el presente estudio, con estas concentraciones es posible que el plomo llegue también a las terminales nerviosas donde altere la actividad de la SON.



Las concentraciones de Pb en capilares y sinaptosomas que se observaron con los tratamientos utilizados en el presente estudio mostraron un perfil diferente sobre la actividad de la SON, i.e., provocaron un aumento en la actividad de la iSON en capilares, mientras que la actividad de la SONc en sinaptosomas se redujo.

Una posible explicación para estos resultados es que la actividad de la SONc en sinaptosomas es inhibida por una interacción del plomo sobre los sitios de unión de calcio, como en el complejo calcio-calmodulina, mientras que la expresión de la SONi en capilares aumenta con el plomo. Al acumularse este metal en capilares cerebrales induce un aumento en la actividad de la SONi, y como esta isoforma produce una elevada concentración de ON que se mantiene por un tiempo prolongado, puede a su vez dar origen a alteraciones o muerte celular (Jaffrey y Snyder, 1995). La neurotoxicidad de ON en capilares puede ser el resultado de la formación de peroxinitritos, producto de la combinación de ON con el anión superóxido, lo que causa peroxidación lipídica (Gross, 1995).

Los resultados descritos en esta sección sugieren que el plomo que se deposita en capilares induce un rompimiento de

la BHE, subsecuente a la elevada producción de ON, permitiendo un aumento de la entrada de Pb a las terminales nerviosas.

Es importante hacer notar que con los tratamientos aplicados en esta fase de experimentación, la intensidad de los efectos sobre la actividad de la SON fueron similares en todas las dosis, lo que puede indicar que se alcanzó una meseta de saturación del proceso, aún con la concentración más baja. Por tal motivo, se realizó una segunda fase empleando dosis de exposición que permitieran tanto conocer el umbral del efecto, como determinar si con la intoxicación subaguda existe un daño específico en regiones cerebrales relacionadas con procesos cognitivos, basándonos en reportes que indican una distribución heterogénea del plomo en regiones cerebrales. Para continuar el estudio, se utilizaron fracciones sinaptosomales de hipocampo, cerebelo, corteza frontal y tallo (como región de referencia no cognitiva), se continuó el estudio con ratas adultas macho para lograr obtener la cantidad de sinaptosomas de cada región necesaria para realizar los análisis.

## **2. SEGUNDA FASE.**

En esta fase se determinaron los efectos de diversas dosis de exposición a plomo sobre la actividad de la SONc de sinaptosomas de regiones cerebrales.

### **Hipótesis.**

Después de una exposición subaguda en ratas adultas, el plomo se deposita de forma heterogénea en las regiones estudiadas, alterando de manera diferencial la actividad de la SONc de los sinaptosomas de las regiones cerebrales.

### **Objetivo**

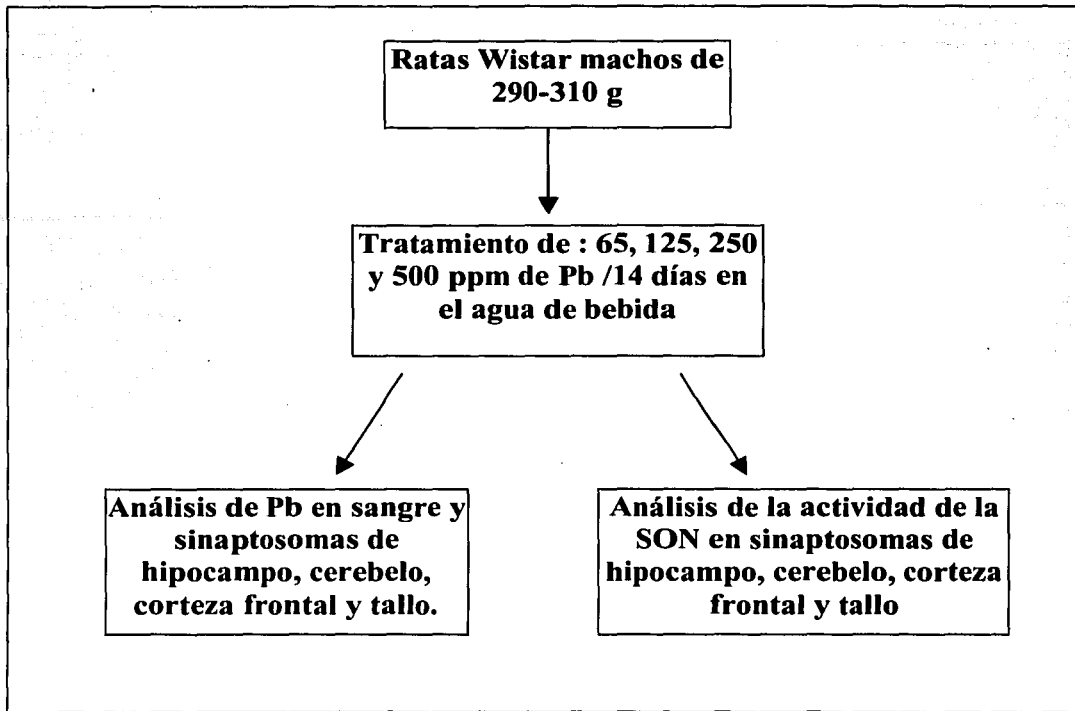
Analizar la actividad de la SONc en sinaptosomas de hipocampo, cerebelo, corteza frontal y tallo de ratas adultas intoxicadas con plomo.

## Métodos

### Animales

Se utilizaron ratas Wistar machos de 290-310 g de peso. Se trabajó con 5 grupos tratados con concentraciones de 0, 65, 125, 250 y 500 ppm de plomo administrado en el agua de bebida durante 14 días. Después del tratamiento se procedió a la disección del hipocampo, el cerebelo, la corteza y el tallo cerebral para obtener los sinaptosomas de dichas regiones (de acuerdo con la técnica antes mencionada). Se utilizaron tres ratas para obtener el tejido necesario para lograr cantidades de sinaptosomas suficientes de cada región para realizar el análisis de la actividad de la SONc. Se trabajó con una n de 6 para cada grupo.

En esta fase se analizaron las concentraciones de plomo en sangre y en los sinaptosomas de las cuatro regiones, así como la actividad de la sintasa del óxido nítrico proveniente de sinaptosomas de cada región de estudio. Para ello se empleó la misma metodología descrita anteriormente.



Esquema 2. Diagrama de flujo del diseño experimental de la fase dos.

## **Análisis estadísticos.**

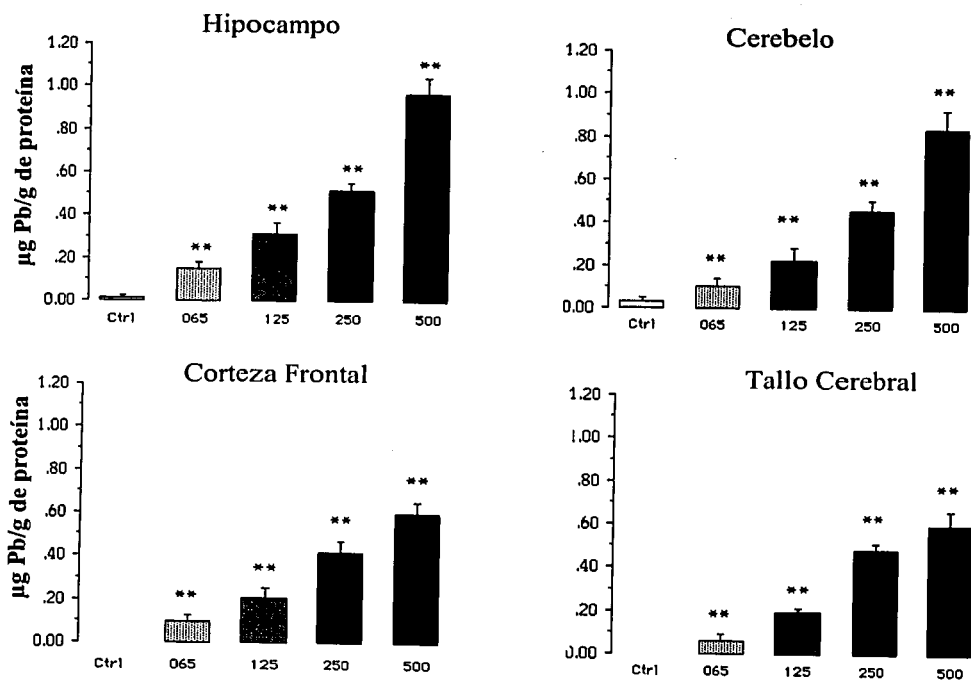
Los valores obtenidos en cada parte experimental fueron sometidos a la prueba estadística de análisis de varianza, seguido de la prueba de Tukey. Se consideró la diferencia estadística a nivel de significación de  $p \leq 0.05$ .

## **Resultados**

En esta segunda fase experimental realizada en ratas, se encontró un aumento significativo en las concentraciones sanguíneas de plomo con la aplicación de las diferentes concentraciones del metal. Se obtuvo un valor promedio de  $7.2 \pm 0.42 \mu\text{g/dl}$  en el grupo control, mientras que en los grupos de 65, 125, 250 y 500 ppm de Pb se encontraron concentraciones promedio de  $16.9 \pm 0.97$ ,  $24.6 \pm 1.36$ ,  $25.5 \pm 1.56$  y  $32.3 \pm 1.81 \mu\text{g/dl}$  de plomo, respectivamente. Estos resultados fueron significativamente diferentes en todos los grupos con respecto al control.

En la gráfica 7 se muestran las concentraciones de plomo encontradas en las regiones cerebrales estudiadas en los grupos que recibieron los diferentes tratamientos. Los valores en todas las regiones fueron dependientes de la dosis. Sin embargo, como se muestra en esta gráfica, las concentraciones más elevadas se encontraron en el hipocampo con valores de:  $0.012 \pm 0.00$ ,  $0.149 \pm 0.02$ ,  $0.311 \pm 0.04$ ,  $0.574 \pm 0.04$  y  $0.995 \pm 0.07 \mu\text{g}$  de Pb/g de proteína, para los tratamientos de 0, 65, 125, 250 y 500 ppm de plomo, respectivamente.

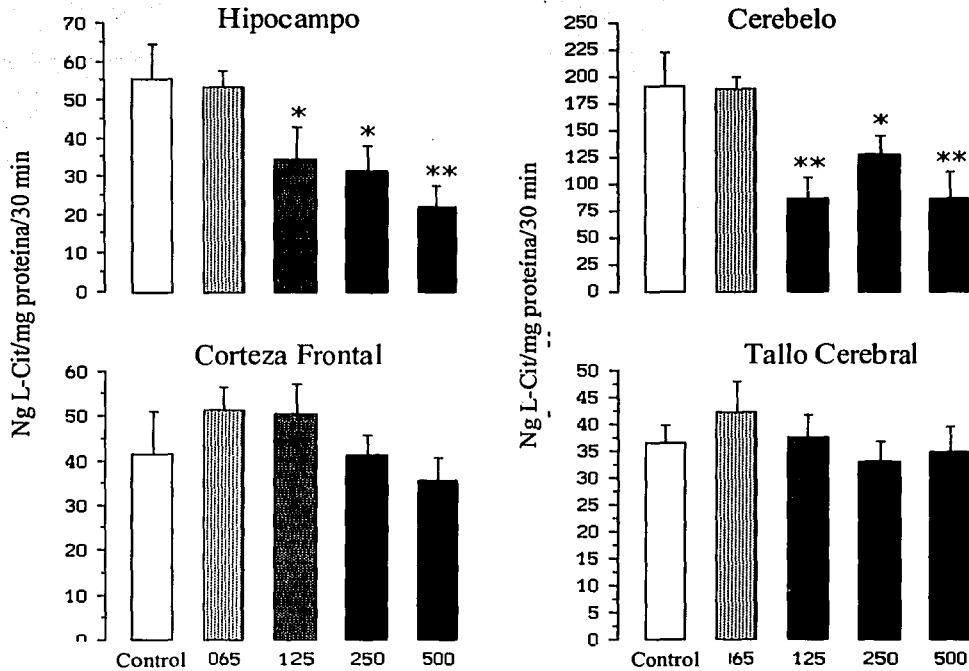
En lo que respecta a la actividad de la SONc en las cuatro regiones de estudio y en relación con los tratamientos empleados, se observó una inhibición de la actividad enzimática en hipocampo y cerebelo de manera dosis dependiente, siendo significativa a partir de las dosis de 125 ppm de Pb. En la corteza frontal y el tallo cerebral no se presentaron cambios significativos en la actividad de esta enzima (Gráfica 8).



**Gráfica 7.** Concentraciones de plomo en sinaptosomas de las cuatro regiones estudiadas con los diferentes tratamientos. Cada barra representa el promedio ( $\pm$  EE). Diferencia estadística del grupo control; \* \* $p \leq 0.01$ . ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





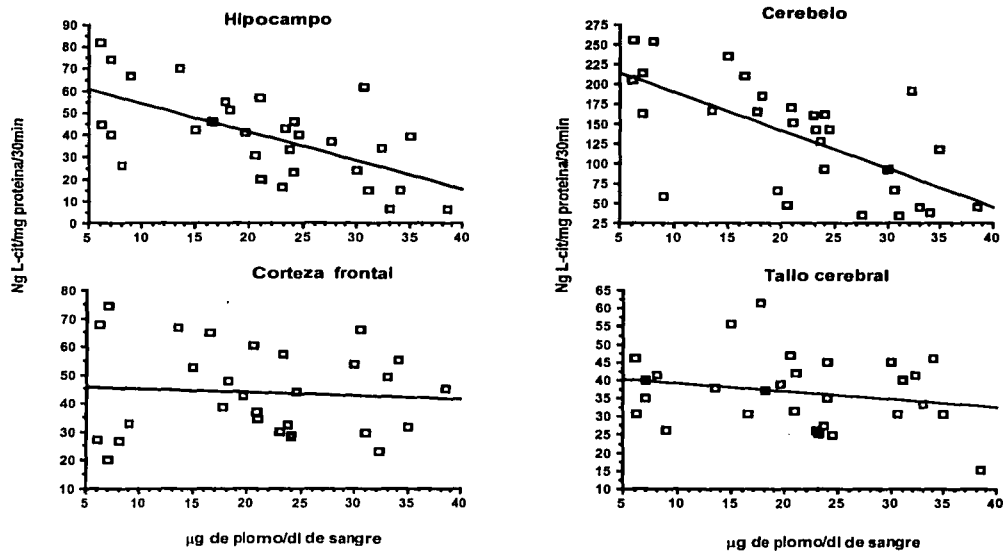
**Gráfica 8.** Promedio de la actividad de la SONc de sinaptosomas en hipocampo, cerebelo, corteza frontal y tallo cerebral de ratas expuestas a diferentes concentraciones de plomo. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Con fines descriptivos se realizó un análisis de correlación entre las concentraciones de plomo sanguíneo y la actividad de la SONc para las diferentes regiones. Tal como se muestra en la gráfica 9. Existe una correlación negativa en el hipocampo ( $-0.627$ ,  $p < 0.01$ ) y en el cerebelo ( $-0.657$ ,  $p < 0.01$ ), situación que no se presenta en la corteza frontal ( $0.073$ ) ni en el tallo cerebral ( $0.043$ ). Estos resultados sugieren que la exposición al plomo afecta de manera diferencial a las distintas regiones cerebrales estudiadas.

## Discusión.

Los resultados mostrados por los sinaptosomas de las diferentes regiones estudiadas muestran que la acumulación de plomo provoca una inhibición selectiva de la actividad de la SONc en el hipocampo y el cerebelo, sin afectar significativamente la actividad de la enzima en la corteza frontal ni en el tallo cerebral. Esta selectividad regional del efecto del plomo no puede explicarse sólo por la acumulación de plomo en estas regiones, ya que el plomo se acumula de manera dosis-dependiente en todas las regiones estudiadas, aunque en el hipocampo se observaron concentraciones más elevadas que en corteza frontal o tallo



**Gráfica 9.** Gráficas de correlación entre las concentraciones de sangre y actividad de la SONc en: hipocampo, cerebelo, corteza frontal y tallo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

cerebral. Sin embargo, se puede ver que con las concentraciones más bajas de plomo que inhibieron la actividad de la SONc en hipocampo, en corteza frontal y tallo no se produjeron cambios significativos en la actividad de la enzima.

Estos resultados son congruentes con los encontrados por otros investigadores (Fjerdingstad et al., 1974), quienes determinaron la existencia de una acumulación preferencial del plomo en hipocampo, lo cual ocasiona una mayor susceptibilidad del hipocampo al plomo.

Otro estudio muestra también esta diferencia en la distribución de plomo en las regiones cerebrales. En trabajo realizado con tratamientos crónicos iniciando el tratamiento a los 3 días de nacidos, se reportó la presencia de una concentración mayor del metal en el hipocampo que en el estriado, la corteza y tallo cerebral. Ese efecto se observó cuando la duración del tratamiento fue de 4 semanas, mientras que con el mismo tratamiento durante 6 y 8 semanas no se observó una gran variabilidad regional en la acumulación del plomo en las regiones después de la exposición (Collins et al., 1982). Existen también reportes en los cuales no encontraron diferencias en cuanto a la distribución del metal

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

en las regiones cerebrales (Widzowski, 1994). Esta diversidad en los resultados publicados y los obtenidos en este estudio, puede indicar que los parámetros de tratamiento no definen con exactitud el comportamiento cinético en cerebro del plomo. Sin embargo con este estudio, empleando un corto tiempo y variando las concentraciones no existe una gran heterogeneidad de distribución en las regiones cerebrales.

Los resultados obtenidos en esta fase de la investigación coinciden con los datos reportados por Quinn et al. (1995) y Blazka et al. (1994), quienes demostraron con estudios *in vitro* que la incubación con Pb libre inhibe la actividad de la SONc. Quinn reportó que esta inhibición causada por Pb puede revertirse al aumentar las concentraciones de calcio en el medio de incubación de homogeneados del cerebelo. Este hecho puede estar relacionado con la alta afinidad que tiene el Pb por los sitios de unión de calcio en proteínas como la calmodulina. De acuerdo con nuestros resultados se puede sugerir que las concentraciones del plomo logradas con los tratamientos tuvieron un efecto bloqueador sobre el complejo calcio-calmodulina, logrando inhibir la actividad de la SONc. Sin embargo, este mecanismo no puede ser del todo responsable de la inhibición de la actividad de la cSON en el hipocampo y el cerebelo, ya que la misma isoforma, dependiente del

complejo calcio-calmodulina, está presente en las cuatro regiones que se analizaron.

Otro mecanismo que pudiera estar involucrado en la inhibición de la actividad de la SONc, es el bloqueo de los receptores a glutamato del subtipo NMDA. Varios estudios muestran que la exposición a plomo produce cambios en el receptor NMDA al actuar como un antagonista no competitivo en el sitio de unión a la glicina del receptor (Ujihara y Albuquerque, 1993; Uteshev et al., 1993). Se ha sugerido también que el plomo puede actuar en el sitio de unión a  $Zn^{2+}$  del complejo receptor NMDA, ya que el plomo presenta mayor afinidad por estos sitios de unión que el mismo  $Zn^{2+}$  (Bressler et al., 1999). Este dato es importante porque se menciona que el hipocampo y el cerebelo son regiones con altas concentraciones de receptores NMDA así como también altas concentraciones de  $Zn^{2+}$  (Sawashita et al., 1997). Un mecanismo más que pudiera estar participando en este efecto, es el relacionado con los cambios en la expresión del gen y las proteínas de las subunidades del receptor NMDA. Se ha reportado que la exposición a plomo produce una reducción selectiva de la síntesis de proteína y del gen de las subunidades del receptor NMDA en diferentes áreas del hipocampo (Nihei et al., 2000). Estos posibles mecanismos pueden impedir tanto la

entrada de calcio necesario para activar la SON constitutiva, como la producción de ON y la formación del LTP.

Algunos investigadores también han señalado cierta especificidad regional de los efectos del plomo en el cerebro. Cory-Slechta (1997) reporta cambios marcados en la recaptura de dopamina en nucleus accumbens, pero no en el estriado como respuesta a la exposición al plomo durante las etapas del destete y postnatal.

Así también, Silbergeld (1992) ha sugerido que los efectos neuroquímicos del plomo parecen estar más relacionados con un neurotransmisor en regiones específicas, que a un neurotransmisor específico.

Estos resultados del efecto inhibitorio del plomo sobre la actividad de la SONc en hipocampo y cerebelo determinan un efecto específico en regiones relacionadas con los procesos de aprendizaje y memoria, lo que podría indicar un mecanismo que pudiera estar relacionado con las alteraciones cognitivas reportadas por la exposición a plomo, sugiriendo también que existe una susceptibilidad bioquímica en animales expuestos a bajas dosis de plomo durante la etapa adulta.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **3. TERCERA FASE.**

De acuerdo con los resultados de Bohme y cols. (1993) la inhibición de la producción del ON afecta la capacidad de memoria en las ratas. En ese estudio, mostraron que el ON está involucrado en algunas formas de memoria, y apoyaron la existencia de una relación entre LTP, aprendizaje y memoria espacial. Por tales razones siguiendo el mismo esquema de tratamiento, nos propusimos hacer una extensión del trabajo hasta aquí realizado para determinar si esta inhibición de la SONc pudiera estar relacionada a su vez con una inhibición de la LTP hipocampal en animales expuestos a plomo.

#### **Antecedentes**

##### **Potenciación a Largo Plazo (LTP).**

Un modelo experimental frecuentemente empleado para estudiar los cambios a nivel sináptico que subyacen al aprendizaje y la memoria, es la LTP hipocampal (Collingridge, 1987; Bliss y Collingridge, 1993).



La LTP es un fenómeno que puede ser inducido y estudiado *in vivo* o en rebanadas de tejido cerebral (*in vitro*), en el cual la eficiencia de la transmisión sináptica se aumenta de inmediato por horas o semanas, a consecuencia de la aplicación de trenes de estimulación tetánica. Dicha estimulación promueve a nivel postsináptico la entrada de calcio a través de los receptores glutamatérgicos del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Esta entrada de calcio a través de los receptores tipo NMDA es un requerimiento a nivel postsináptico para la inducción de LTP (Huang, 1997).

Los experimentos describen que la LTP requiere de la activación del receptor y la despolarización de la neurona postsináptica. Los dos eventos son inducidos por una fuerte estimulación de alta frecuencia de las fibras presinápticas. El glutamato liberado de las terminales presinápticas actúa sobre varios tipos de receptores: los ionotrópicos NMDA y no-NMDA, AMPA/kainato, así como los receptores metabotrópicos. La activación de los dos primeros provoca la entrada de calcio para despolarizar a la célula postsináptica. Durante una estimulación de baja frecuencia, los receptores no-NMDA median más rápidamente la excitación sináptica, ya que los canales asociados a receptores NMDA son bloqueados por magnesio en condiciones de reposo. La despolarización

provocada por la activación de receptores AMPA/Kainato remueve el bloqueo por  $Mg^{+2}$  del canal receptor NMDA, y generan una corriente entrante de calcio.

La inducción de la LTP requiere de la activación postsináptica de los receptores NMDA, y su mantenimiento necesita de un aumento en la liberación de neurotransmisores presinápticos, lo cual se consigue gracias a los mensajeros retrógrados, los cuales son liberados por las células postsinápticas.

Existen evidencias que sugieren que la LTP se relaciona con un aumento en la liberación de glutamato (Bliss y Collingridge, 1993), sugiriendo que a nivel postináptico se envía un mensajero al axón terminal presináptico para inducir la LTP (Medina e Izquierdo, 1995).

### **Efecto del plomo sobre la LTP.**

El hipocampo es una región importante para el almacenamiento de la memoria en humanos y en otros mamíferos, siendo además el área donde se presenta una intensa y persistente LTP en relación con otras áreas cerebrales. Se ha mostrado que un tren corto de estimulación de alta frecuencia en la vía perforante produce un aumento en la amplitud de los

potenciales sinápticos excitadores en las células granulares (Gilbert et al., 1996).

Estudios previos demostraron que la exposición aguda a plomo libre en rebanadas de hipocampo, disminuye la inducción del LTP hipocampal (Altmann et al., 1991). Varios estudios posteriores realizados en rebanadas de hipocampo de ratas adultas que habían estado expuestas crónicamente a plomo durante diferentes etapas de desarrollo, mostraron un bloqueo de la inducción de la LTP en el hipocampo, estos estudios sugirieron que los animales expuestos principalmente en la etapa prenatal son más susceptibles a alteraciones por la exposición a plomo (Altmann et al., 1993; Gutowski et al., 1998).

Las investigaciones que emplean el modelo de LTP en el hipocampo de ratas expuestas a plomo en edad temprana, determinaron que la exposición a este metal provoca un aumento en el umbral para la inducción y una disminución en la magnitud de la LTP (Gilbert et al., 1996; Gilbert et al., 1999).

## Participación del Oxido Nítrico en la LTP.

El ON está involucrado en múltiples procesos del sistema nervioso central, entre los que se encuentran los mecanismos de plasticidad sináptica como la LTP, la depresión a largo plazo (LTD), el aprendizaje, y la formación de la memoria (Zou et al., 1998).

Se demostró que el aprendizaje espacial es capacidad cognitiva que se ha visto más afectada después de la administración sistémica de inhibidores de la SON (Zou et al., 1998).

La estimulación repetida de las fibras ascendentes en el cerebro también incrementa la liberación de ON, evento que puede ser bloqueado con la administración de la N<sup>o</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA), un inhibidor de la SON. O'Dell y cols. (1991) observaron que la LTP en CA1 puede inhibirse por la aplicación de nitro-arginina, la cual ingresa a la célula postsináptica y bloquea la SON.

También observaron que la hemoglobina administrada en el espacio extracelular se une al ON, logrando interrumpir el desarrollo de la LTP. Este grupo de investigadores sugiere que el aumento espontáneo de ON incrementa la liberación de

neurotransmisores como el glutamato, por lo que el ON actuaría como un mensajero retrógrado en la LTP.

Una cuestión importante consiste en determinar el tipo de SON que está involucrado en el desarrollo de la plasticidad sináptica. La isoforma de SON predominante en las neuronas es la SONn, aunque se reportó que tanto el hipocampo como otras regiones cerebrales también expresan a la SONE (Dinerman et al., 1994).

Experimentos realizados con ratones mutados en la forma neuronal de la sintasa del óxido nítrico (SONn<sup>-</sup>) y de la endotelial (SONe<sup>-</sup>), así como en ratones doblemente mutados (SONn<sup>-</sup>/SONe<sup>-</sup>), proporcionaron evidencias sólidas de que la SON constitutiva está involucrada en la LTP hipocampal. Se reportó que la SONE es la isoforma que se encuentra más relacionada con la LTP, y se sugiere que la forma neuronal puede compensar la falta de actividad de la forma endotelial o viceversa, en los ratones con una sola mutación (Son et al., 1996).

Los estudios de varios grupos de investigadores demostraron la existencia de una relación entre el óxido nítrico y el aprendizaje y la memoria. Por ejemplo, Chapman y cols. (1992), emplearon la prueba de laberinto de agua para

demostrar el papel del ON en el aprendizaje de tipo espacial. Los autores emplearon ratas tratadas con L-NAME (inhibidor inespecífico de la SON) durante los períodos de entrenamiento, y observaron un deterioro en el proceso de la memoria, especialmente en la adquisición del aprendizaje espacial. Por otro lado, Othon y col. (1993) aplicaron intrahipocampalmente L-NAME a grupos de ratas 10 minutos antes de ser entrenadas en una tarea de prevención pasiva. Los animales mostraron un deterioro de la memoria, efecto que fue revertido al administrar L-Arginina.

### **Hipótesis.**

Si la actividad de SONc está relacionada con el desarrollo de la LTP, y la exposición a plomo en las ratas adultas inhibe la actividad de la SONc en sinaptosomas de hipocampo, entonces la LTP hipocampal *in vivo* será inhibida en los animales expuestos.

### **Objetivo**

Analizar los efectos de la exposición a plomo con diferentes dosis sobre la LTP hipocampal *in vivo* en ratas adultas.

## Métodos.

Para indagar la posible relación del efecto inhibitor observado en la actividad de la SONc, utilizamos un modelo de ratas adultas bajo el mismo esquema de tratamientos anteriores, con el propósito de evaluar la LTP hipocampal *in vivo*.

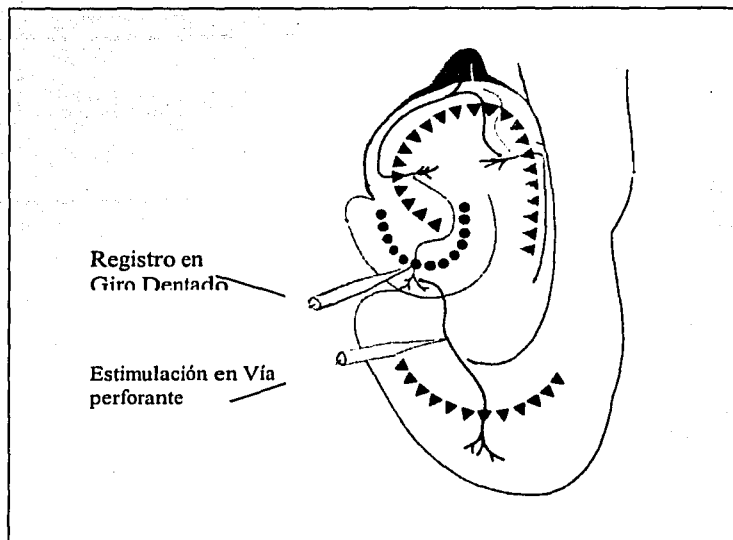
### Animales.

Se utilizaron ratas Wistar adultas con las mismas características para el grupo control (n=3), 65 (n=3), 125 (n= 2), 250 (n=4) y 500 (n= 3) ppm de Pb durante 14 días de exposición en el agua de bebida.

Después del tratamiento con plomo los animales se anestesiaron con nembutal (50 mg/kg ip) y se les mantuvo a una temperatura de 35 °C utilizando una cama caliente. Las respuestas de Giro Dentado (GD) se registraron unilateralmente usando un electrodo monopolar de acero inoxidable (0.005 in de diametro, Medwire, Chicago, IL) localizado en las coordenadas estereotáxicas (3.5 posterior a Bregman, 2-2.2 lateral a la línea media, ventral a la dura - 3.0). La estimulación fue unilateral en las coordenadas de la

vía perforante (VP) (8.1 posteriores al Bregma, 4.4 lateral a la línea media y ventral a la dura -3.0) usando un electrodo bipolar de acero inoxidable. La corriente de la estimulación fue de pulsos monofásicos de 30-40  $\mu$ A y 0.1-0.25 min de duración, utilizando un estimulador Grass S48 y liberada a un electrodo estimulador a través de una unidad de aislamiento del estímulo (PSIU6). La respuesta evocada fue amplificada con un preamplificador Grass P5, filtrada a 0.1 Hz-10 Hz y almacenada utilizando el programa de cómputo BrainWave (Esquema 4). Al medir la respuesta se obtuvo la pendiente de los potenciales postsinápticos excitadores (EPSP) de campo. La intensidad de corriente que ejerció un 50% de la respuesta máxima se usó para la estimulación, incluyendo la inducción de LTP. La LTP fue inducida por cuatro trenes de estimulación de 1-seg a 100 Hz, con un intervalo de 20 seg. Se continuó la estimulación de alta frecuencia en la VP registrando la respuesta durante una hora después de los trenes de estímulo. La LTP se calculó como porcentaje del cambio con respecto al promedio de la pendiente de los potenciales de campo después de la tetanización.





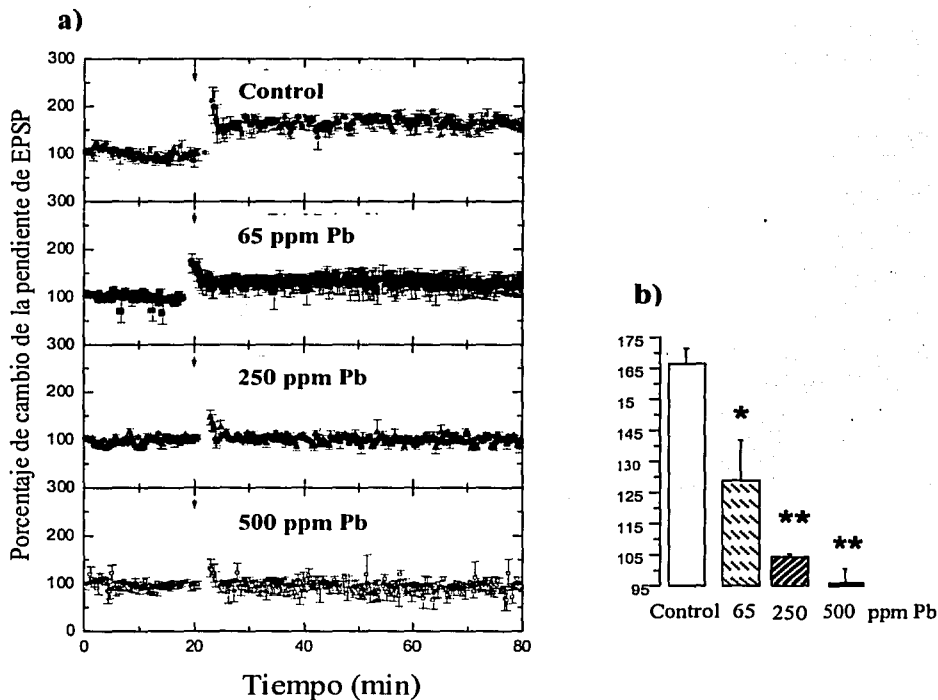
**Esquema 4.** Procedimiento empleado para inducir la potenciación a largo plazo hipocampal (Tomada de Carlson, 1994).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El promedio de la amplitud de los potenciales provocados registrados posteriormente al conjunto de trenes se comparó con la amplitud de respuestas a un estímulo basal. La LTP se determinó como el aumento de 20% o más sobre la amplitud de pico obtenido con el estímulo de prueba, previo a la aplicación del tren de estímulo.

## Resultados.

En la figura 10a se muestran los registros *in vivo* antes y después de la inducción del LTP por la estimulación de la vía perforante en ratas tratadas con 65, 250 y 500 ppm de Pb. En las gráficas se muestran los cambios en el porcentaje de la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP). La flecha indica el momento en que se estimula por medio de cuatro trenes de estímulos aplicados a 100 Hz. Se observa que los EPSPs en animales control se potenciaron después de la aplicación de los trenes, los cuales se mantuvieron durante la hora de registro después de la inducción. Los registros obtenidos en las ratas tratadas con plomo muestran una inhibición parcial, en los animales tratados con 65 ppm, y un bloqueo total de la LTP con las dosis de 250 y 500 ppm de Pb después de su inducción (Gráfica 10a). Los porcentajes de cambio de las pendientes de los EPSPs en los diferentes grupos fueron de  $163.5 \pm 0.7$ ,  $128.22 \pm 0.5$ ,  $101.09 \pm 0.58$  y  $92.4 \pm 0.83$  para los grupos control, 65, 250 y 500 ppm de Pb, respectivamente (Gráfica 10b).



**Gráfica 10.** a) Cambios en los registros de las pendientes de los EPSPs de los grupos tratados, la flecha indica el tiempo en que fue inducido el estímulo. b) Cada barra representa el promedio ( $\pm$  EE) del porcentaje de cambio de las pendientes de los EPSP de cada grupo de estudio. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $\leq 0.01$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Discusión.

Este estudio muestra que la exposición a plomo afecta la LTP hipocampal en animales adultos de manera dosis-dependiente. Existe una inhibición a partir de la dosis de 65 ppm de plomo, y un bloqueo total del desarrollo de la LTP con las dosis de 250 y 500 ppm de plomo. Este bloqueo electrofisiológico puede estar relacionado con la inhibición de la actividad de la SON observada en sinaptosomas de hipocampo y que fue reportada en la fase anterior de este trabajo.

Con los datos obtenidos en la LTP de la sinapsis hipocampal se puede afirmar que este parámetro neurofisiológico es un índice sensible de la integridad del mecanismo sináptico, el cual parece estar altamente comprometido por la exposición a plomo, inclusive a bajas dosis y administrado durante un tiempo corto. Dado que el bloqueo de la LTP hipocampal se relaciona con la inhibición de la actividad de la SONc, se sugiere que este cambio neuroquímico es el mecanismo responsable de que no se desarrolle este parámetro electrofisiológico.

La inhibición de la LTP en animales expuestos a Pb en el circuito VP-GD observada en este estudio, coincide con los resultados obtenidos por Altmann y colaboradores (1993), quienes reportaron una inhibición de la LTP en rebanadas de hipocampo de ratas, sin embargo, este estudio fue llevado a cabo con tejido de animales expuestos a bajas concentraciones de Pb durante la etapa gestacional terminando la exposición a los 2 y 7 meses de edad, sin encontrar cambios en los animales que iniciaron su exposición después del destete.

En otro estudio llevado a cabo por Gilbert y colaboradores (1999) se reportó una reducción en la magnitud de LTP en ratas que iniciaron su exposición previa al nacimiento y después del destete. Las razones de estas diferencias no son muy claras, aunque se puede decir de acuerdo con nuestros resultados, que la exposición al metal durante el desarrollo no es determinante para que se presenten efectos neurotóxico.

Los resultados del presente estudio también muestran claramente que no existe una ventana de susceptibilidad específica durante la etapa temprana a la intoxicación por plomo, como se ha manejado en la mayoría de los trabajos que

han investigado este tema. Con los datos de que disponemos gracias al presente trabajo aseguramos que en la población expuesta durante la etapa adulta, es probable que se presenten alteraciones importantes en los procesos bioquímicos y electrofisiológicos relacionados con el aprendizaje y la memoria, los cuales muestran una clara vulnerabilidad a la exposición con bajas dosis de plomo.

Los resultados hasta aquí obtenidos sugieren que el aprendizaje y la memoria están afectados en los animales adultos expuestos a plomo, teniendo en cuenta que la formación de la LTP hipocampal está a su vez relacionada con los procesos de la memoria y el aprendizaje. Para comprobar este posible efecto, decidimos realizar la siguiente fase.

## 4. CUARTA FASE

### Antecedentes

#### Neurotoxicidad del Plomo

Los efectos nocivos del Pb en el sistema nervioso central se manifiestan con problemas tanto del aprendizaje, como del funcionamiento intelectual, de la atención y de la concentración (Baghurst et al., 1992). En dosis altas (más de 70  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ), puede provocar encefalopatía, ataxia, convulsiones y coma (Goyer, 1993).

Estudios epidemiológicos mostraron que la carga corporal de plomo en niños se correlaciona con una mayor susceptibilidad a la distracción, hiperactividad, deficiencia en el desempeño escolar, y bajo coeficiente intelectual (IQ), (Rice, 1995; Rice et al., 1996; Bressler et al., 1999). En este conjunto de estudios se encontró que la relación entre los niveles de plomo y las deficiencias en el IQ eran notablemente consistentes. Algunos estudios reportaron que por cada incremento de 10  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de plomo en sangre, la media del IQ en los niños disminuía de cuatro a siete puntos. Se discute que

posiblemente este efecto no ocasiona un impacto detectable en un solo niño en particular; sin embargo, una disminución de 5 puntos de IQ, puede tener una repercusión notable sobre las características de una población (Rice et al., 1996).

A pesar de que se reportó la presencia de alteraciones en las funciones cognoscitivas en sujetos con niveles menores a los 10  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , no se ha identificado el umbral, ni el tiempo que transcurre para que se produzcan estos efectos, así como ni los mecanismos que los desencadenan.

Estudios realizados en ratas y en monos, mostraron también alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria después de la exposición a plomo. Estos resultados sugieren que el desempeño en las pruebas conductuales pueden ser particularmente sensible a la exposición a plomo (Rice, 1995).

Como dichas investigaciones se centran en el estudio de los efectos provocados por la exposición en la etapa gestante, y en la etapa temprana de desarrollo después del nacimiento, se definieron a esos periodos como los más sensibles a la exposición al plomo. Sin embargo, existen estudios que reportan que la exposición iniciada en la etapa juvenil puede ocasionar anormalidades en la conducta (Gilbert et al.,



1999). Esto sugiere que la exposición durante los períodos de desarrollo temprano no es indispensable para que se presenten los cambios relacionados con la función cognoscitiva.

Existen pocos estudios realizados en adultos expuestos al Pb, por lo que los datos de neurotoxicidad en esta población no son muy claros. Este hecho puede deberse a la diversidad de las pruebas realizadas, a las diferentes edades y a los tiempos de exposición. Algunos estudios neurológicos y psiquiátricos en trabajadores expuestos, reportaron la presencia de síntomas no específicos, tales como fatiga, depresión, irritabilidad, disminución de la libido y dolor de cabeza. Algunos investigadores sugieren que en la edad adulta el efecto del plomo se expresa más claramente en el sistema nervioso periférico, y a nivel del sistema nervioso central sólo se manifiestan con cambios en el estado de ánimo (Silbergeld, 1992). Otros resultados de la investigación en población adulta, destacan efectos en los procesos de aprendizaje y memoria, como el tiempo de reacción, memoria verbal y atención (Cory-Slechta, 1995).

En estudios con animales, algunos autores reportan que los roedores adultos son extremadamente resistentes a los efectos neurotóxicos después de la exposición a plomo (Rice et al., 1996b). Se menciona que el plomo produce neurotoxicidad en

roedores adultos después de una exposición aguda, pero esto solamente sucede con dosis que producen una pérdida de peso significativa y mortalidad. Las características de la exposición necesaria para inducir un efecto neurotóxico en humanos adultos no ha sido aún determinada y los efectos del plomo sobre la función cognoscitiva son contradictorios. En general, el plomo no se relaciona claramente con efectos nocivos sobre el aprendizaje durante esta etapa (Rice, 1996b).

Estudios conductuales establecen que las ratas y monos pueden ser usados como modelo en estudios de neurotoxicidad relacionados con plomo (Bressler et al., 1999). Dada la naturaleza no específica de los cambios en el IQ, los estudios en modelos animales son importantes para determinar los efectos en el aprendizaje inducidos por la exposición a plomo. Estos modelos han proporcionado una medición directa de este proceso conductual, eliminando las variables que provocan confusión (como estatus socioeconómico, IQ de padres, etc.) y que afectan la puntuación del IQ empleada en los estudios con seres humanos.

## **Hipótesis**

Dado que la exposición a plomo inhibe la actividad de la sintasa del óxido nítrico y el desarrollo de la LTP, estos efectos bioquímicos y electrofisiológicos se reflejan en una deficiencia de la capacidad del aprendizaje y la memoria de ratas expuestas.

## **Objetivo.**

Determinar el efecto de la exposición subaguda a plomo sobre el desempeño en las pruebas de laberinto en agua y prevención pasiva de ratas adultas.

## **Métodos.**

### **Pruebas cognitivas.**

#### **Laberinto de agua.**

Esta prueba consiste en entrenar a las ratas en un laberinto de agua durante dos sesiones diarias de diez pruebas cada una. La prueba para el animal consistió en llegar a una

plataforma localizada en una posición fija y sumergida un cm por debajo de la superficie del agua de una bañera circular negra con 1.5 m de diámetro y 1.0 m de alto. La bañera estuvo localizada en un cuarto oscuro, iluminado con una luz tenue y rodeado de varias señales espaciales. Se emplearon diez diferentes sitios (pruebas) para que las ratas iniciaran nadando la búsqueda de la plataforma, se les dieron 60 seg como tiempo máximo para llegar a ellas, e inmediatamente después se les llevó a su caja de acrílico por 30 seg, para continuar con la prueba siguiente. Si el animal no llegaba a la plataforma en el tiempo límite, se le guiaba con la mano hasta la plataforma. Se empleó un sistema computarizado Chromotrock, y una cámara de video para registrar los movimientos de las ratas y la determinación de las latencias de llegada a la plataforma. Siete días después del primer procedimiento se llevó a cabo la sesión de prueba en la que se eliminó la plataforma para conocer el total de veces que pasaba la rata por el sitio donde había estado la plataforma (número de cruces). Los animales se mantuvieron nadando por 2 min. Tanto la latencia para llegar a la plataforma como el número de cruces se tomaron como índices de memoria (Ramírez-Amaya et al., 1999; Nerda et al., 1996).

## Prevención Pasiva.

Los animales de este experimento fueron entrenados en una caja (89 X 18 X 12.5 cm) dividida en dos compartimentos por una guillotina que cae más abajo del piso de la caja; y separa dos compartimentos; uno de ellos de seguridad con 29 cm de largo que se mantuvo iluminado por un foco de 40 w y otro compartimento, de castigo, no iluminado de 60 cm donde los animales recibían un choque eléctrico. Durante la sesión de adquisición el animal se colocó manualmente en el compartimento iluminado por 30 seg, después de este tiempo se abrió el acceso al compartimento no iluminado. Cuando las cuatro patas de la rata se encontraban en el compartimento de castigo, la puerta se cerraba y se aplicaban choques eléctricos de 0.8 mA por 3 seg; al finalizar el tiempo se abría la puerta para el compartimento iluminado. En el experimento todos los animales recibieron 10 pruebas de entrenamiento, en cada prueba la rata se ubicaba en el compartimento iluminado y cuando la puerta se abría, se iniciaba la medición de la latencia de entrada al compartimento no iluminado. Se administraba un choque eléctrico cuando la rata entraba al compartimento obscuro, midiendo el tiempo de su permanencia en este sitio. Se mantenía a la rata por 60 seg en el compartimento iluminado

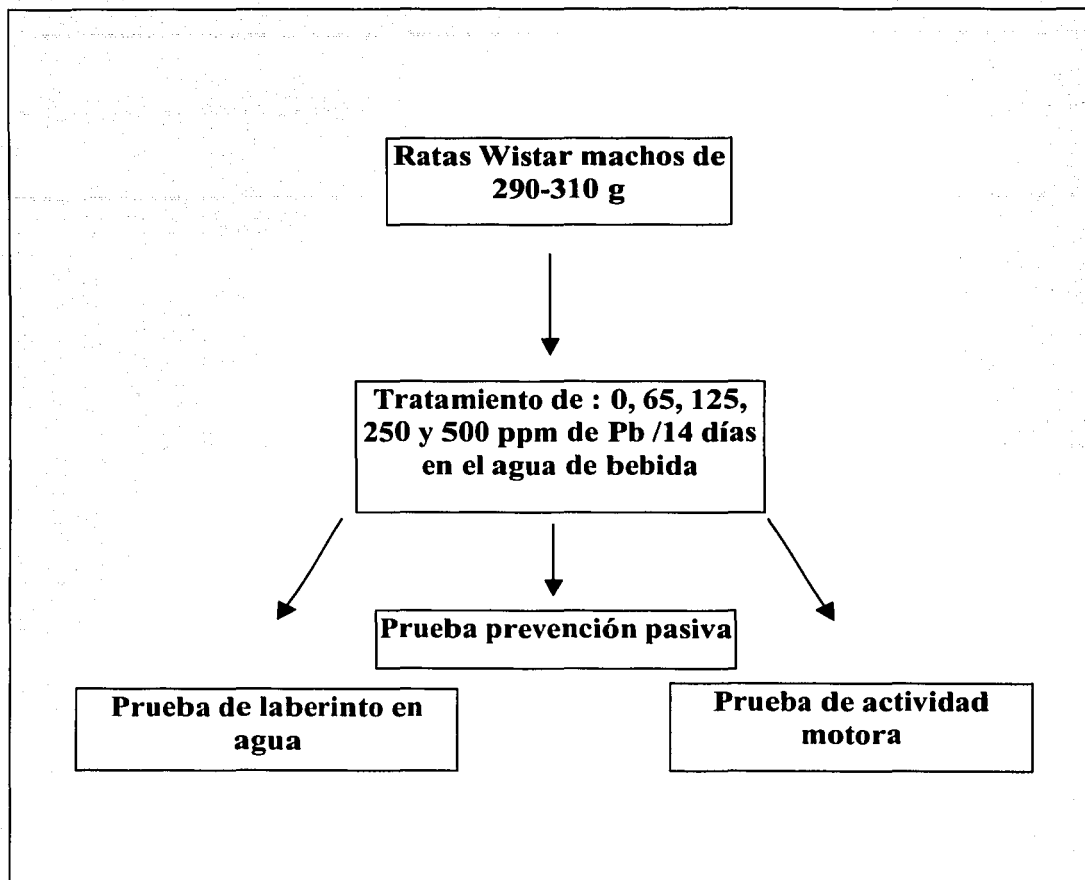
para continuar con la siguiente prueba (Bermudez-Rattoni et al., 1997).

### **Actividad motora.**

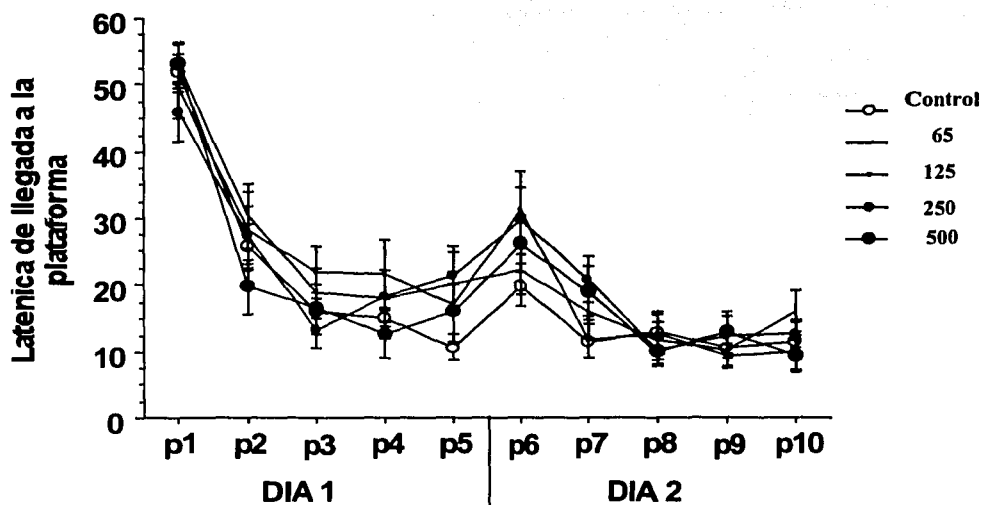
Se registró la actividad motora colocando a la rata en una caja rectangular de 40 por 60 cm. Se siguió la trayectoria de la rata con una cámara de video conectada a una computadora, para determinar la distancia recorrida y el número de veces que pasaba por los diferentes cuadrantes de que se divide el espacio de la prueba. La actividad motora fue monitoreada durante 10 minutos.

### **Resultados.**

Los resultados obtenidos en la prueba de laberinto de agua se muestran en la gráfica 11. En ella, se observa un comportamiento similar en todos los grupos, disminuyendo el tiempo empleado para llegar a la plataforma durante los dos días de entrenamiento, lo que indica que no hay diferencia en la prueba de adquisición con los diferentes tratamientos.



**Esquema 5.** Diagrama de flujo del diseño experimental de la fase tres.



**Gráfica 11.** Tiempo promedio durante la fase de adquisición en la prueba de laberinto en agua de los animales que recibieron los diferentes tratamientos de plomo. Cada punto es la latencia promedio  $\pm$  EE de dos pruebas consecutivas para llegar a la plataforma.

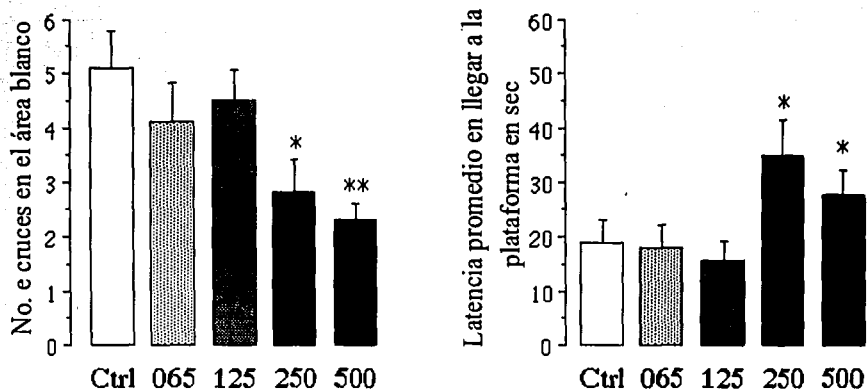
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Sin embargo, en la prueba realizada siete días después de la última sesión de entrenamiento (Gráfica 12), hubo una diferencia significativa en el número de cruces al sitio blanco en los grupos de 250 y 500 ppm en relación con el grupo control (Gráfica 12a). La latencia para llegar a la plataforma también mostró diferencia significativa con los animales tratados con 250 y 500 ppm de Pb (Gráfica 12b).

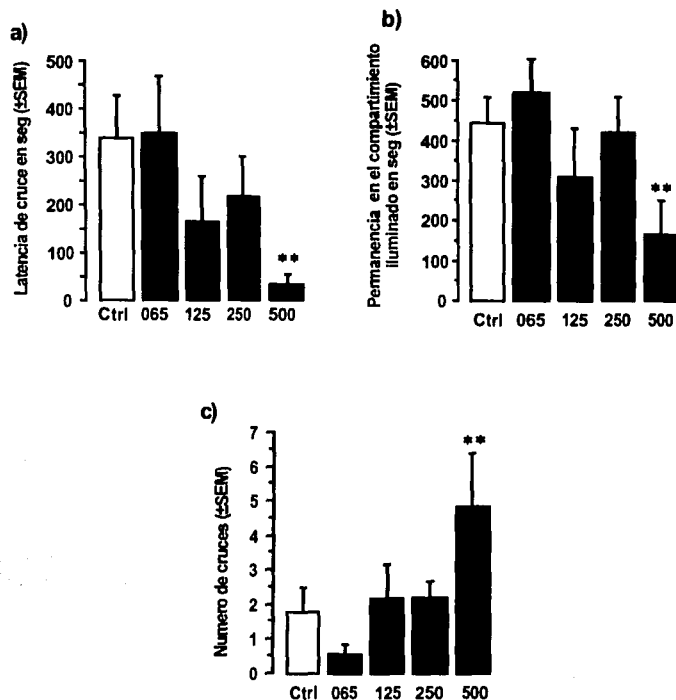
Los resultados obtenidos con la prueba de prevención pasiva se muestran en la gráfica 13. Al igual que la prueba anterior, no se encontró diferencias en la prueba de adquisición en los animales tratados. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la prueba de consolidación, solamente entre el grupo control y el tratado con 500 ppm de Pb, como lo muestra el tiempo que permanecen en el compartimento iluminado (Gráfica 13a), la misma diferencia significativa se observó en el tiempo de latencia para cruzar (Gráfica 13b) y en el número de cruces al compartimento oscuro (Gráfica 13c) para los animales tratados con 500 ppm de Pb.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



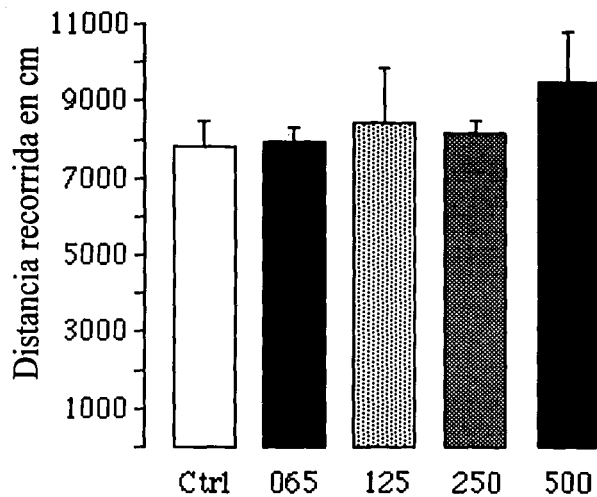
**Gráfica 12.** Prueba de memoria realizada 7 días después de la adquisición. a) Promedio del número de cruces  $\pm$  EE, en el área blanco de los grupos con los distintos tratamientos, b) la figura muestra el promedio de la latencia  $\pm$  EE para llegar a la plataforma de los animales de cada grupo. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $\leq 0.01$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Gráfica 13.** Prueba de memoria en aversión pasiva 7 días después de la sesión de adiestramiento, a) muestra el promedio del tiempo  $\pm$  EE que permaneció en el compartimiento luminoso, b) latencia promedio para cruzar al compartimiento oscuro, c) promedio del número de cruces entre los compartimentos. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $\leq 0.01$ .

La actividad motora no presentó cambios en ninguno de los grupos tratados. La distancia recorrida a campo abierto de los grupos expuestos a plomo no muestra cambios significativos en los animales expuestos (Gráfica 14).



**Gráfica 14.** Actividad motora. Distancia promedio recorrida durante 10 minutos de conducta exploratoria en la caja de campo abierto. Cada barra representa el promedio  $\pm$  error estándar de cada tratamiento.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Discusión.

En esta fase del estudio no se observaron efectos durante la adquisición del aprendizaje por la exposición a plomo. Sin embargo, se mostraron efectos de manera dosis-dependiente en la memoria espacial, siendo significativa la diferencia con las dosis de 250 y 500 ppm de Pb. También encontramos un efecto en la memoria durante la prueba de prevención pasiva, aunque sólo fue significativo cuando empleamos la dosis más alta (500 ppm de Pb).

El cambio en la memoria espacial de los animales de experimentación parece ser el principal efecto conductual modificado por la exposición a plomo. Esto puede explicarse por el hecho de que los efectos del plomo descritos son más importantes en el hipocampo, región relacionada con la integridad de los procesos espaciales. Nuestros resultados muestran que ésta es la región donde se observó la más importante inhibición de la actividad de la SONc y del desarrollo de la LTP bajo los regímenes de tratamientos empleados. Estos mecanismos están estrechamente relacionados con la memoria espacial y por lo tanto, los resultados sugieren que los procesos espaciales son más susceptibles a la intoxicación por plomo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Es importante hacer notar que los efectos cognitivos que observamos no son consecuencia de alteraciones motoras, ya que no se observaron cambios en la prueba de actividad motriz en ningún grupo tratado con plomo.

Estos resultados son contrarios a los reportados por Ma y cols. (1999), quienes investigaron el efecto de la exposición de 1000 ppm de Pb en forma crónica en ratas. Los autores no observaron cambios en el aprendizaje espacial, pero sí un aumento en la actividad locomotora. Algunos estudios han reportado resultados contradictorios por la exposición a plomo, que incluyen hiperactividad e hipoactividad; mientras que otros concuerdan con los resultados del presente estudio donde tampoco se muestran cambios en la actividad locomotora (Ma et al., 1999).

Es importante hacer notar que la inhibición en la actividad de la SONc en cerebelo, puede también estar relacionada con los déficits observados en la memoria, ya que se ha mencionado que el cerebelo puede también participar como una área alternativa o paralela en la consolidación de la memoria (Izquierdo et al., 1993).

Nuestro estudio revela que aunque en animales adultos no se observaron alteraciones en la adquisición del aprendizaje, como previamente se reportó en animales expuestos durante etapas de gestación y postnatal (Jett et al., 1997; Kuhlmann et al., 1997), el plomo sí provocó una falta en la consolidación de la memoria. Estos resultados indican que a partir de concentraciones sanguíneas de plomo de  $25.5 \pm 1.56$   $\mu\text{g/dl}$  en la edad adulta pueden observarse efectos cognoscitivos importantes.

## **CONCLUSION GENERAL.**

Este estudio mostró como resultado importante que la exposición a bajos niveles de plomo durante la edad adulta puede producir efectos neurológicos graves en los roedores adultos.

El estudio realizado con las dos especies muestra que no existe una diferencia en cuanto a las concentraciones sanguíneas bajo el esquema de exposición que empleamos, puesto que las concentraciones de plomo en sangre de ratones y ratas fueron semejantes. Observamos que las concentraciones de plomo en ratones con las dosis de exposición de 250 y 500,

fueron de 21.7 ( $\pm$  2.2) y 35.5 ( $\pm$  1.5), mientras que en ratas fueron de 25.5 ( $\pm$  1.56) y 32.3 ( $\pm$  1.81), con las mismas dosis. Sin embargo, si comparamos las concentraciones de plomo en sinaptosomas de ratones y ratas, podemos decir que existe una marcada diferencia en los datos obtenidos, pero es importante hacer notar que las concentraciones de plomo en sinaptosomas de ratones expuestos se obtuvieron de cerebro completo, a diferencia de los estudios realizados en sinaptosomas que obtuvimos de regiones cerebrales de ratas expuestas. Esto hace pensar que las concentraciones de plomo en cerebro completo de ratones se lograron mayores concentraciones porque incluye regiones circunventriculares que no están protegidas por la BHE y que se sugiere que presentan mayor cantidad de plomo, a diferencia de las regiones que estudiamos con ratas expuestas.

Los datos que obtuvimos con los parámetros analizados muestran efectos dosis-respuesta, tanto en procesos bioquímicos, electrofisiológicos como conductuales con los tratamientos subagudos a plomo en roedores adultos expuestos. Esto indica que el plomo puede alcanzar concentraciones suficientes en regiones cerebrales, para desencadenar dichos efectos. Posiblemente estos niveles de exposición inician mecanismos primarios de alteraciones a nivel de la BHE, lo



que podría alterar la permeabilidad al metal, aumentando el paso del plomo a las terminales nerviosas. En los estudios con exposición durante la etapa gestacional y el período postnatal, las concentraciones elevadas de plomo en cerebro se deben principalmente a que en estos períodos de exposición el cerebro se encuentra en desarrollo y la BHE es inmadura y puede originar el libre paso del plomo al cerebro con el desencadenamiento de cambios en eventos bioquímicos que pueden dar origen a impedimentos cognitivos.

Los resultados de esta investigación permitieron observar un efecto inhibitorio dosis-dependiente de la actividad de la SONc en hipocampo y cerebelo, sin observarse cambios en la actividad en corteza frontal ni tallo cerebral bajo el diseño experimental empleado. Esto no se puede explicar por la presencia de plomo en las regiones, ya que las concentraciones obtenidas fueron dosis-dependiente en las cuatro regiones estudiadas. Sin embargo, las concentraciones en hipocampo fueron más elevadas para cada una de las dosis empleadas con respecto a las concentraciones obtenidas en las demás regiones cerebrales. Estos resultados están de acuerdo con lo publicado por otros investigadores quienes muestran que algunos efectos neuroquímicos producidos por la

intoxicación por plomo varían de acuerdo con la región cerebral (Moresco et al., 1988).

Los resultados revelaron de manera importante que la exposición a plomo en la edad adulta puede alterar procesos bioquímicos en áreas relacionadas con procesos plásticos, como lo mostraron los resultados inhibitorios en la inducción de la LTP hipocampal *in vivo*, aún con bajos niveles de exposición. Resultados similares fueron reportados por Lasley y cols. (1993) quienes mostraron que la exposición crónica a plomo en etapas tempranas de desarrollo impide la inducción de LTP hipocampal en animales anestesiados.

La inducción de la LTP hipocampal en giro dentado depende de la activación de los receptores postsinápticos NMDA (Bliss y Collingridge, 1993; Malenka, 1992). Existen además estudios *in vitro* que reportan que la exposición a plomo interfiere con la función de estos mismos receptores (Ujihara, y Albuquerque, 1992), lo que podría explicar parte de los resultados observados en este estudio. Sin embargo, la especificidad regional observada en la inhibición de la SONc, indica que pueden existir otros mecanismos desencadenados por el plomo que pudieran estar alterando la producción de SONc y como consecuencia la inhibición de la inducción de la LTP.

Una posibilidad es que la exposición a plomo en este modelo pueda alterar la configuración de subunidades de los receptores NMDA, inhibiendo la eficacia de la unión transmisor-receptor.

Estos efectos pueden estar relacionados con la diversidad en las concentraciones de zinc de las subunidades de receptores NMDA y su distribución en las diferentes regiones cerebrales que puedan ser responsables de la variación de los efectos observados en las regiones a la exposición a plomo.

Diversos estudios han revelado la presencia de múltiples subunidades de receptores NMDA (NR1/NR2B), con diferentes propiedades farmacológicas y fisiológicas (Moriyoshi et al., 1991), distribuidos regionalmente en forma diversa (Ishii et al., 1993). Esto puede sugerir que las regiones más afectadas, como el hipocampo y el cerebelo, pueden presentar un tipo particular de subunidades de receptores NMDA que son más susceptible a la intoxicación por plomo. Con los resultados obtenidos en esta investigación no podemos determinar que este mecanismo puede presentarse. Sin embargo, esta hipótesis puede fortalecerse con los resultados presentados por Lau y cols. (2002) que observaron una

diversidad de efectos sobre los receptores en diferentes regiones cerebrales. Reportaron una disminución en la expresión del gen de la subunidad NR2B y NR1 de los receptores NMDA en cultivo de neuronas de hipocampo expuestas a plomo, pero en neuronas corticales no observaron cambios en la expresión de la subunidad NR1, sin embargo, encontraron un aumento significativo en la expresión de la subunidad NR2B.

De los efectos cognitivos observados en este estudio, se puede sugerir que existe una relación entre los efectos bioquímicos y los electrofisiológicos, que pueden ser los mecanismos previos que desencadenen la anormalidad conductual como consecuencia de la exposición subaguda a plomo, siendo necesarios niveles de exposición mayores del metal para que se manifieste un efecto conductual en los animales expuestos. Estos efectos cognitivos están vinculados con las regiones cerebrales que se vieron preferentemente dañadas por el plomo.

Queremos destacar que de acuerdo con este estudio, encontramos que la exposición a dosis bajas de plomo en edad adulta desencadena eventos bioquímicos y electrofisiológicos importantes que se reflejan en deficiencias de los procesos

|cognoscitivos, tal como sucede con la exposición al metal durante la gestación y la etapa temprana postnatal.

Por último, es importante dar a conocer que después de que se publicó recientemente la Norma Oficial Mexicana relacionada con la intoxicación por plomo en los niños, es necesario que se diseñe la Norma Oficial para determinar los niveles de Pb permisibles y medidas de acción para los trabajadores ocupacionalmente expuestos a ese metal. Por ello, son imprescindibles los estudios de las acciones tóxicas, de los mecanismos de absorción y de otros parámetros cinéticos de este elemento, así como tener datos cuantitativos que ayuden a determinar criterios y la Norma tenga un sólido fundamento científico y práctico.

## REFERENCIAS

- Alkondon, DP., Costa, ACS., Radhakrishnan, V., et al. (1990). Selective blockade of NMDA-activated channel currents may be implicated in learning deficits caused by lead. *FEBS Lett.* 261 : 124-130.
- Al Dhaheri, AH., El-Sabban, F. and Fahm, MA. (1995). Chronic lead treatment accelerates photochemically induced platelet aggregation in cerebral microvessels of mice, *in vivo*. *Environ Res.* 69: 51-58.
- Altmann, L., Sveinsson, K., Wiegand, H., (1991). Long-term potentiation in rat hippocampal slices is impaired following acute lead perfusion. *Neurosci. Lett.* 128 : 109-112.
- Altmann, L., Weinsberg F., Sveinsson, K., Lillenthal, H. Et al., (1993). Impairment of long-term potentiation and learning following chronic lead exposure. *Toxicology Lett.* 66: 105-112.
- American Academy of Pediatric Committee on Environmental Health (1991). Lead poisoning: from screening to primary prevention. *Pediatrics.* 92 : 176-83.
- Arancio, O., Kiebler, M., Lee, CJ., et al., (1996) Nitric oxide directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell.* 87: 1025-1035.
- Baghurst, PA., McMichael, AJ., Wigg, NR., et al. (1992) Environmental exposure to lead and children's intelligence at the age of seven years. The Port Price Cohort Study. *N. Engle. J. Med.* 327:1279-1284.
- Blazka, ME., Harry, GJ., Luster, MI., et al., (1994) Effect of lead acetate on nitrite production by murine brain endothelial cell cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126: 191-4.
- Bliss, TVP and Collingridge, GL. (1993). A synaptic model of memory : Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361 : 31-39.
- Bohme, GA., Bon, CH., Lemaire, M., et al. (1993) Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 9191-94.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Bredt, DS., Hwang, PM., and Snayder, SH. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768-770.

Bredt, DS, and Snayder, SH. (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*. 8: 3-11.

Bressler, J., Kim, K., Chakraborti, T., et al. (1999) Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochem Research*. 24 (4): 595-600.

Bressler, J and Goldstein, GW. (1991). Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochemical Pharmacology*. 41 (4): 479-484.

Chapman, PF., Atkins, CM., Allen, MT., et al. (1992) Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport*. 3:567-570.

Collins, MF., Hrdina, PD., Whittle, E., et al., (1982) Lead in blood and brain regions of rats chronically exposed to low doses of metal. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 65: 314-322.

Cory-Slechta, DA. (1995). Relationships between lead-induced learning impairments and changes in dopaminergic, cholinergic, and glutamatergic neurotransmitter system functions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35 : 391-415.

Cory-Slechta, DA. (1997). Relationships between Pb-induced changes in neurotransmitter system function and behavioral toxicity. *Neurotoxicology*. 18: 673-688.

Dinerman, JL., Dawson, TM., Schell, MJ., Snowman, A., Snyder, SH. (1994) Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 4214-4218.

Forsterman, U., Schmith, HHHW., Pollock, JS., et al. (1991). Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* 42 (10): 1849-57.

Garthwaite, J. (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14 : 60-7.

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

Gilbert, ME., Mack, CM., Lasley, SM. (1999). The influence of developmental period of lead exposure on long-term potentiation in the adult rat dentate gyrus in vivo. *Neurotoxicology*. 20 (1) : 57-69.

- Goyer, RA., (1993) Lead toxicity: Current concerns. *Eviron. Health. Perspect.* 100 : 177-187.
- Goldstein, GW. (1993). Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism *Neurotoxicology.* 14 (2-3): 97-102.
- Gross, SS. (1995) Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 737-69.
- Gross, SB., Plitzer, E., Yeager, DU., et al. (1975). Lead in human tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 32: 638-651.
- Gutowski, M., Altmann, L., Sveisson, K., Wiegand, H. (1998) Synaptic plasticity in the CA1 and CA3 hippocampal regions of pre- and postnatally lead-exposed rats. *Toxicol. Lett.* 95: 195-203.
- Hernández-Avila, M. y Palazuelos-Rendon, E. (1995). El plomo: un problema de salud pública en México En: Intoxicación por plomo en México: Prevención y Control. México, D.F. Perspectivas en salud pública.
- Hawkins, RD., Son, H., Arancio, O. (1998). Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res.* 118 : 155-172.
- Holscher, Ch. (1997). Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger : its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 20 :298-303.
- Huang, EP. (1997). Synaptic plasticity : A role for nitric oxide in LTP. *Current Biology.* 7 :R141-R143.
- Ignarro, LJ. (1991). Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* 41 (4) : 485-490.
- Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., et al., (1993) Molecular characterization of the N.methyl-D-aspartate receptor subunits *J. Biol. Chem.* 268: 2836-43.
- Izquierdo, I., Medina JH., Bianchin, M., Walz, R., et al., (1993). Memory processing by the limbic system: role of specific neurotransmitter systems. *Behav. Brain Res.* 58: 91-98.
- Jett, DA., Kuhlmann, AC., Farmer, SJ., Guilarte, TR. (1997). Age-dependent effects of developmental lead exposure on performance in the Morris Water Maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57 (1-2): 271-279.
- Kuhlmann, AC., McGlothlan JL., Guilarte TR. (1997). Developmental lead exposure causes spatial learning deficits in adult rats. *Neuroscience Lett.* 233: 101-104.



- Lau, WK., Yeung, CW., Lui, PW, Cheung, LH., Poon, NT., Yung, KK. (2002) Different trends in modulation of NM;DAR1 and NMDAR2B gene expression in cultured cortical and hippocampal neurons after lead exposure. *Brain Res.* 932:10-24.
- Lasley, SM., Polan-Curtain, J. and Armstrong DL. (1993). Chronic exposure to environmental levels of lead impairs in vivo induction of long-term potentiation in rat hippocampal dentate. *Brain Res.* 614: 347-351.
- Ma, T., Chen, HH and Ho IK. (1999). Effects of chronic lead (Pb) exposure on neurobehavioral function and dopaminergic neurotransmitter receptors in rats. *Toxicology Lett.* 105: 111-121.
- Matte, TD., Props, D., Palazuelos, E., Graef, J., Hernandez, MA. (1994). Acute high-dose lead exposure from beverage contaminated by traditional Mexican pottery. *The Lancet.* 344: 1064-1065
- Malenka, RC (1992) The role of postsynaptic calcium in the induction of long-term potentiation. *Mol Neurobiol.* 5: 289-295.
- Medina, JH., Izquierdo, I. (1995) Retrograde messengers, long potentiation and memory. *Brain Research Reviews.* 21: 185-194.
- Miller, DT., Paschal, DC., Gunter, EW., et al. (1987). Determination of lead in blood using electrothermal atomisation atomic absorption spectrometry, a platform and matrix modifier. *Analyst.* 112: 1701-1704.
- Moncada, S., Palmer, RMJ. and Higgs, EA. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1709-1715.
- Moresco, RM., Dall'Olio, R., Gandolfio, O., Govoni, S., Di Giovine, S. and Trabucchi, M (1988) Lead neurotoxicity: a role for dopamine receptors. *Toxicology.* 53: 315-322.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Nakanishi, S (1991). Molecular cloning and characterisation of the rat NMDA receptor. *Nature.* 354: 31-37.
- Nerda, L., Ramírea-Amaya, V., Ormsby, Ch., et al., (1996) Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning. *Neurobiol. Learning and Memory.* 66:44-50.
- Needleman, HL. (1992) Human lead exposure. Boca Raton Florida, EUA. De. Needleman pp 123-150.

- Nihei, MK., Desmond, NL., McGlothan, JL., Kuhlman, AC., Guilarte, TR. (2000) N-methyl-D-aspartate receptor subunits changes are associated with lead-induced deficits of long-term potentiation and spatial learning. *Neuroscience*. 99 (2): 233-42.
- Nilsson, GE. and Soderstrom, V. (1997). Comparative aspects on nitric oxide in brain and its role as a cerebralvasodilator. *Comp. Biochem Physiol. A Physiol* 118: 949-58.
- O'Dell, TJ, Hawkins, RD., Kandel, ER., and Arancia, O. (1991). Tests of the roles of two diffusible substances in LTP: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci*
- Ohthon, M., Ya,a,oto, T., Watanabe, S., (1993) Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat. *Brain Research*. 632: 36-40.
- Palminger, HI., Jonsson, S., Karlson, MO and Oscarsson, A. (1996). Kinetic observations in neonatal mice exposed to lead via milk. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 140: 13-18.
- Payton, M., Riggs, KM., Spiro, A., et al. (1998). Relations of bone and blood lead to cognitive function: The VA normative aging study. *Neurotoxicol. Teratol*. 20(1): 19-27.
- Prast, H and Philippu, A. (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology*. 64 (1):51-68.
- Quinn, MR. and Harris, CL., (1995). Lead inhibits Ca(2+)-stimulated nitric oxide synthase activity from raat cerebellum. *Neurosc.Lett*. 196: 65-68.
- Ramírez-Amaya, V., Escobar, ML., Chao, V., et al. (1999) Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus*. 9: 631-636.
- Rice DC. (1995) Neurotoxicity of Lead, Methylmercury, and PCBs in Relation to the Great Lakes. *Environ Health Persps*. 103 (Suppl 9): 71-87.
- Rice DC. (1996) Behavioral Effects of Lead : Commonalities between Expeirmental and Epidemiologic Data. *Environ. Health Perspect*. 104 (Suppl. 2) 337-351.
- Rice DC., Duffard AME., Duffard R., et al., (1996b) Lessions for Neurotoxicology from selected model compounds: SGOMSEC Joint report. *Env. Health Persps*. 104 (Suppl 2): 205-215.
- Rojas-López, M., Santos-Burgoa, C., Rios, C., Hernández-Avila, M., Romieu, I. (1994) Lead-Glazed ceramics is the main factor associated to high lead in blood levels in two mexican rural communities. *J. Toxicol. Environ. Health*. 42: 45-52.

- Sanhir, R and Gill KD. (1994). Alterations in calcium homeostasis on lead exposure in rat synaptosomes. *Mol. Cel. Biochem.* 131: 25-33.
- Sawashita J, Taakeda A, Shoji O. (1997). Change of zinc distribution in rat brain with increasing age. *Dev. Brain Res.* 102: 295-298
- Schuman, EM and Madison, DV. (1991). A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long term potentiation. *Science.* 254 : 1503-1506.
- Silbergeld, EK. (1992) Mechanisms of lead neurotoxicity, or looking beyond the lamppost. (1992) *SASEB J.* 6: 3202-06.
- Smith, DR., Osterloh, JD., Flegal, AR. (1995) Use of Endogenous Stable Lead Isotopes to Determine Release of Lead from the Skeleton. *Env. Health Perspect.* 104 (1): 60-66.
- Son, H., Hawkins, DR., Martin K., et al., (1996). Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell.* 87: 1015-23.
- Stuehr, DJ, Choi, HJ, Kwon, NS, et al. (1991). Purification and characterization of cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD and FMN- containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7773-7777.
- Ujihara, H. and Albuquerque EX. (1993). Developmental change of the inhibition by lead of NMDA-activated currents in cultured hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 263:868-875.
- Uteshev, V., Busselberg, D. and Hass, HL. (1993).  $Pb^{2+}$  modulates the NMDA-receptor-complex channel. (1993) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 347:209-213.
- Widzowski, DV. and Cory Slechta, DA., (1994) Homogeneity of regional brain lead concentration. *Neurotoxicology.* 15:295-308.
- Zhan, J and Snyder SH. (1995). Nitric oxide in the nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 213-33.
- Zou, Li-Bo, Yamada, Kiyofumi, Tanaka, T., et al. (1998) Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a arm maze task in rats. *Neuropharmacology.* 37:323-330.