



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CAMPUS TUXTEPEC

"Efecto de la intoxicación con plomo en ratas gestantes"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniera en Biotecnología

PRESENTA:

SARIBEL ZILLI GUTIÉRREZ

Director: Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA 2020

Copia de acta de revisión de tesis

Copia de oficio de autorización de tesis

## **Hoja de Originalidad.**

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

## **I. AGRADECIMIENTOS**

Eternamente a DIOS por llevarme siempre en el camino y en el lugar preciso, por haberme guiado en todos los momentos tristes y felices de mi vida, ejemplo mismo es la realización y culminación de este trabajo.

A mis padres: José Ángel Zilli Lara y Paula Gutiérrez Gutiérrez, quiénes sin duda alguna son mis ángeles terrenales, ellos que sin estimar esfuerzos son y serán siempre el amor más grande que ha tocado mi vida. Gracias por ser siempre la mayor fuente de admiración e inspiración para mi superación personal.

A mis hermanos mayores Ángel Omar y Raúl quiénes siempre están a mi lado y forman parte fundamental del amor más grande y sincero que tengo. así como también son y serán siempre mi fuente de inspiración y superación.

A la Universidad del Papaloapan por haberme aceptado como estudiante dentro de sus instalaciones. Agradezco a la Lic. Yesenia Barrientos Arenal jefa del departamento de servicios escolares de la universidad, quién me brindó el apoyo y el acompañamiento durante mi estancia en la carrera de Ingeniería en Biotecnología.

A mi asesora: la Dra. Leticia Navarro Moreno quien me brindó la confianza y me abrió las puertas en su equipo de investigación, agradezco que ella me enseñó todos los buenos valores relacionados a un buen manejo de trabajo de investigación, creando en mí el deseo de continuar pese a cualquier dificultad. Me brindó el acompañamiento en todas las fases de realización de este trabajo, teniendo siempre el consejo necesario, la paciencia y el entendimiento en diversas circunstancias que se manifestaron durante el desarrollo de este proyecto, siendo más que una asesora, es parte también de mi inspiración. Gracias por creer en mí y por cada palabra que ayudó a romper muchas inseguridades.

A la Dr. Blanca Estela Barrera Figueroa y el Dr. Julián Mario Peña Castro quiénes me brindaron la confianza y permitieron realizar mis experimentos en el laboratorio de Biotecnología vegetal.

A mi honorable comité revisor.

A mis buenos compañeros de laboratorio, hoy mis grandes amigos: Felipe, Joaquín, Héctor, Brandon, David, Mirthsa y Lucero, con quiénes compartí toda clase de vivencias, cada uno hizo que mis días tuvieran alegría agradezco de todos sus buenos consejos y apoyo fraterno.

A la hermana que la vida me dio Cecilia, es la persona que siempre ha estado conmigo incondicionalmente, siendo siempre un impulso positivo en mi vida.

José Antonio, quien llegó a mi vida en el momento adecuado para ser alguien importante, brindándome siempre su apoyo incondicional en todas las dificultades y compartiendo conmigo la felicidad.

A quiénes estuvieron conmigo en el inicio de esta decisión y que por razones del destino y la vida ya no se encuentran cerca de mí.

## II. DEDICATORIA

Para ustedes familia, que me dieron la oportunidad de realizarme profesionalmente, dándome la mejor herencia que se puede llegar a obtener y que hoy en día valoro y aprecio como el mejor obsequio. Recuerdo mucho el día en el que los 5 sentados en la mesa decidimos este gran cambio con lágrimas, pues jamás nos habíamos separado, pero con muchas ilusiones y en la espera de un buen resultado, sabíamos que el camino no sería nada fácil. Pero cada una de sus palabras fueron la motivación que necesitaba, cada fin de semana me llenaba de su energía para poder continuar.

***“Atravesar el río que un día vimos en sueños, con mucha esperanza decía Mamá.”***

***“Estoy siempre atrás de ti, con mucha fuerza y apoyo decía Papá.”***

***“No seas confiada y dejada, con mucho ejemplo decía Omar”***

***“Está prohibido rendirse, con mucho ejemplo decía Raúl.”***

Estas palabras me acompañaron y seguirán en mi vida. Hoy les puedo decir que hemos pasado esta etapa con la frente en alto y a ustedes les dedico este logro, espero dedicarles muchos más.

## V.INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL. ....	1
1.1. METALES PESADOS Y SUS EFECTOS EN LOS SERES VIVOS .....	2
1.2. CONTAMINACIÓN POR PLOMO EN MÉXICO.....	3
1.3. EFECTOS DEL PLOMO EN EL MEDIO AMBIENTE.....	6
1.4. EFECTOS DEL PLOMO EN LA SALUD. ....	7
1.4.1.Sistema nervioso .....	8
1.4.2.Sistema urinario .....	9
1.4.3.Sistema hematopoyético .....	12
1.5. EFECTOS DEL PLOMO EN LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA.....	12
1.5.1. Gestación.....	12
1.5.2. Lactancia.....	15
1.6. EFECTOS DEL PLOMO EN LAS MADRES EMBARAZADAS EN MEXICO Y OAXACA.....	16
1.7. ENZIMA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN LA SUSCEPTIBILIDAD HACIA AGENTES TÓXICOS. ....	19
2. JUSTIFICACIÓN .....	33
3. HIPÓTESIS .....	34
4. OBJETIVOS.....	34
4.1. GENERAL.....	34
4.2. ESPECÍFICOS. ....	34
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	35
5.1 GRUPOS EXPERIMENTALES. ....	35
5.2 ENSAYOS BIOQUIMICOS.....	36
5.2.1 Examen general de orina. ....	36
5.3 MEDICIÓN DE PROTEÍNAS EN SUERO, ORINA Y HOMOGENEIZADO DE RIÑÓN, CEREBRO E HÍGADO POR MÉTODO DE LOWRY MODIFICADO (NAVARRO-MORENO, 1999).....	37
5.4 CUANTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN MUESTRAS DE HOMOGENEIZADO DE RIÑÓN, HÍGADO, CEREBRO, TIMO, BAZO Y OVARIOS. ....	39
5.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST) EN MUESTRAS DE HOMOGENEIZADO DE RIÑÓN, HÍGADO, CEREBRO, SUERO, ORINA, TIMO, BAZO Y OVARIOS. ....	40
5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	41

6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	42
6.1.	PESO CORPORAL DE LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN. ....	42
6.2.	PESO DE ÓRGANOS DE LOS GRUPO DE ESTUDIO. ....	44

## VI.INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fuentes de contaminación por plomo en niños y jóvenes de México (Tomado de Monroy, 2014 y de páginas de mercado libre anunciadas por internet) .....	5
Figura 2. Zonas de México contaminadas con plomo y en el recuadro la concentración de este metal en sangre determinada en niños (Tomado de Flores-Ramírez, R, 2012). .....	6
Figura 3. Distribución del plomo en los diferentes órganos comunicados por el sistema circulatorio en los humanos (Navarro, 2004).....	8
Figura 4. Procesos por los cuales el plomo entra a las células renales del túbulo proximal (Navarro, 2004). .....	9
Figura 5. Cambios morfológicos en riñones expuestos plomo de manera crónica. A, B y C muestran la membrana basal, las mitocondrias y los núcleos de células de túbulo proximal de animales sin exponer al metal y D, E y F los cambios que ocurren en las células de animales expuestos a plomo (tomado de Navarro, 2009). .....	11
Figura 6: Transporte de nutrientes en la placenta reportada (Cetin,2010).....	14
Figura 7. Reacción entre la proteína y los reactivos (Tomado de <a href="http://www3.uah.es">www3.uah.es</a> ). .....	38
Figura 8. Esquema de la reacción entre malondialdehído y ácido tiobarbitúrico (Feliciano,2019). ....	39
Figura 9. Especies reactivas de oxígeno en cerebro, hígado y riñón de los grupos de estudio (n=6). .	54
Figura 10. Especies reactivas de oxígeno en timo, bazo y ovarios de los grupos de estudio (n=6).....	55
Figura 11. Actividad de GST en cerebro, hígado y riñón en los diferentes grupos de estudio .....	58
Figura 12. Actividad de GST en el bazo de los diferentes grupos de estudio (n=6).....	60
Figura 13. Actividad de GST en el bazo de los diferentes grupos de estudio (n=6).....	61
Figura 14. Actividad de GST en los ovarios de los diferentes grupos de estudio (n=6).....	61
Figura 15. Actividad de GST en suero de los diferentes grupos de estudio (n=6). .....	62
Figura 16. Actividad de GST en orina de los diferentes grupos de estudio (n=6).....	63

## VII.INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Niveles de plomo en sangre umbilical y sus efectos en la salud en 40 individuos. (Modificado de Castro-Bedriñana et al., 2013) .....	27
Tabla 2. Peso corporal de los roedores al inicio y al final del tiempo de experimentación (n=6). .....	42
Tabla 3. Peso de los órganos de los roedores al inicio y al final del tiempo de experimentación (n=6). .....	45
Tabla 4. Relación peso corporal y peso de los órganos en los animales de estudio (n=6). .....	46
Tabla 5. Longitud de los ovarios, el timo y el bazo de los animales de estudio (n=6). .....	47
Tabla 6. Número de crías y peso de las mismas en los grupos de estudio (n=6). <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Tabla 7. Número de crías y peso de las mismas en los grupos de estudio (n=6).....	50
Tabla 8. Examen general de orina de los grupos de estudio (n=6). .....	52
Tabla 9. Interpretación de los valores de analitos determinados por el Examen General de Orina en los grupos de estudio (n=6). .....	52

## **VIII.ABREVIATURAS:**

**BHT:** Butirilhidroxitolueno.

**BLL:** Nivel de plomo en sangre.

**BSA:** Albúmina sérica bovina.

**BUN:** Nitrógeno ureico en sangre.

**DNCB:** 2,4-dinitroclorobenceno.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético.

**EROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**ERNS:** Especies reactivas de nitrógeno.

**FSH:** Hormona folículo estimulante.

**GDNB:** Glutación-dinitrobenceno.

**GPT:** Transaminasa glutámico-pirúvica.

**GSH:** Glutación Reducido.

**GSSG:** Glutación oxidado.

**GST:** Glutación S-Transferasa.

**GSTM1:** Glutación S-Transferasa Mu 1.

**HMM:** Mezcla de metales pesados.

**ip:** Intraperitoneal.

**LH:** Hormona luteinizante.

**MDA:** Malondialdehído.

**MDR:** Proteína 1 asociada a Resistencia a Múltiples Fármacos.

**NAG:** N-acetilglutaminasa.

**PBS:** Buffer fosfato salino.

**PON:** Paraoxonasa.

## **1 RESUMEN:**

El plomo es un elemento químico contaminante del ambiente; las concentraciones de este elemento han aumentado conforme es utilizado en la fabricación de utensilios de uso cotidiano. Dos de los grupos más vulnerables son las mujeres y los niños en los cuales afecta los sistemas nervioso, hematopoyético, renal, hepático, endócrino y reproductor. El sistema hormonal permite la comunicación y regulación de mensajeros químicos durante la etapa de desarrollo intrauterino de las crías y de la madre. En este trabajo se usaron ratas hembra de la cepa Wistar, las cuales fueron divididas en un grupo control, un grupo expuesto a plomo, un grupo expuesto a hormonas anticonceptivas (levonogestrel y etinil estradiol) y un cuarto grupo tratado con la combinación de hormonas y plomo. Los efectos del plomo y de las hormonas por separado ocasionaron aumento de las especies reactivas de oxígeno y disminución de la actividad de la enzima Glutatión S-transferasa, sin embargo, no ocasionaron efectos graves en el tiempo de gestación de las madres, el número de crías y el peso de las mismas. Cuando se administraron las hormonas anticonceptivas a las ratas junto con el plomo se observó que los efectos fueron mayores. El nivel de especies reactivas de oxígeno aumentó en la mayoría de los órganos, para el caso del cerebro en los grupos plomo, hormona y hormona más plomo hubo un incremento de 7.6, 13.8 y 34 unidades con respecto al grupo control, en el hígado sólo el grupo hormona más plomo aumentó, en el riñón, sólo en el grupo hormona más plomo incrementó en 12 unidades, los resultados en las glándulas estudiadas, reflejaron un aumento en el caso de timo hubo un aumento de 15, 28 y 30 unidades para los grupos plomo hormona y hormona más plomo, en el bazo sólo hubo un incremento de 27 unidades para el grupo hormona más plomo de las glándulas ovarios hubo un incremento de 7, 13 y 17 unidades respectivamente para los grupos plomo, hormona y hormona más plomo con respecto al grupo control. La actividad de la enzima. Lo anterior correlacionó con el hecho de que las hembras aumentaran de peso y algunos de sus órganos también. De la misma forma el periodo gestacional se alargó y el número de crías y el peso de las mismas disminuyó drásticamente. Las observaciones anteriores pueden sugerir que existe un proceso de sinergismo entre el agente tóxico y las hormonas anticonceptivas orales empleadas en este estudio.

## **2 ABSTRACT**

Lead is a chemical element that pollutes the environment; The concentrations of this element have increased as it is used in the manufacture of everyday utensils. Two of the most vulnerable groups are women and children in which it affects the nervous, hematopoietic, renal, hepatic, endocrine and reproductive systems. The hormonal system allows the communication and regulation of chemical messengers during the stage of intrauterine development of the offspring and the mother. In this work, female rats of the Wistar strain were used, which were divided into a control group, a group exposed to lead, a group exposed to contraceptive hormones (levonogestrel and ethinyl estradiol) and a fourth group treated with the combination of hormones and lead. The effects of lead and hormones separately caused an increase in reactive oxygen species and decreased activity of the Glutathione S-transferase enzyme, however, they did not cause serious effects on the mother's gestation time, the number of offspring and their weight. When the contraceptive hormones were administered to the rats together with the lead it was observed that the effects were greater. The level of reactive oxygen species increased in most of the organs and glands studied, as well as the activity of the enzyme. The above correlated with the fact that females gained weight and some of their organs as well. In the same way the gestational period was extended and the number of offspring and their weight decreased drastically. The above observations may suggest that there is a process of synergism between the toxic agent and the oral anthocypptive hormones used in this study.



### **3 INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL.**

La contaminación es el resultado de la existencia de desperdicios generados por un gran número de actividades industriales en las cuales se realiza la manipulación de diversos materiales orgánicos e inorgánicos para el beneficio de la vida humana. Entre estas industrias la minería y las corporaciones dedicadas a la transformación, la fundición y la metalurgia son las más importantes (Caravanos, 2014). Los contaminantes pueden esparcirse en el ambiente y ser capaces de llegar a diversos organismos ocasionando daño en los sistemas comprometidos en las funciones vitales como el hematopoyético, el renal, el nervioso y el reproductor.

No es que todo el problema de contaminación tenga su origen en la actualidad ya que este problema ha estado siempre de la mano con el desarrollo de la humanidad y de nuestro mismo planeta. Nuestros ancestros dejaron muchas pruebas de su presencia en distintas partes del mundo, como restos de rocas trabajadas, fogatas en cuevas y fragmentos de cerámica y esculturas, así como una gran cantidad de estructuras elaboradas con diferentes materiales, los cuales, se puede decir, fueron los primeros restos y el inicio del proceso de deterioro de la naturaleza.

Sin embargo, conforme ha incrementado la población humana y con ello la tecnología, la cantidad de restos generados por las actividades antropogénicas se ha elevado en forma proporcional, de manera que en la actualidad se arrojan al ambiente alrededor una gran variedad de agentes contaminantes. Un ejemplo de ellos es que se ha reportado la eliminación de aproximadamente 100 millones de toneladas de plásticos en el mundo al año, generando acumulaciones gigantescas de desperdicios de este material en los distintos mares y océanos conocidas como Islas de plástico. Un ejemplo de ellas es la que se encuentra localizada en el océano Pacífico, la cual tiene el tamaño de  $\frac{3}{4}$  de la República Mexicana.

A todo esto, hay que sumarle diversas sustancias que pueden terminar en ríos, lagos y mares como fertilizantes, residuos industriales y metales tóxicos. Un alto porcentaje de estas sustancias, entre ellas los metales pesados, tienen efectos muy graves en la mayoría de los miembros de los ecosistemas incluyendo al humano (Rurik, 2017).

Este trabajo se relaciona con el plomo, elemento clasificado dentro de los metales pesados, los cuales son descritos en la siguiente sección.

### **3.2 METALES PESADOS Y SUS EFECTOS EN LOS SERES VIVOS.**

Son elementos que, aunque no tienen una definición concreta cumplen con diversas características como la de poseer una densidad mayor a la del agua.

Se les llama “pesados” al conjunto de metales o metaloides con gran potencial de causar problemas de salud como consecuencia de la intoxicación con los mismos. En general, estos elementos no son esenciales para las células y pueden ejercer efectos graves en ellas. Algunos de los mecanismos de toxicidad ocasionados por estos elementos son los siguientes.

1. Bloqueo de grupos funcionales esenciales en biomoléculas, debido a la alta afinidad de los cationes metálicos por los grupos sulfhidrilos de las proteínas, específicamente a los residuos de cisteína, lo que ocasiona su desnaturalización.
2. El desplazamiento de centros catiónicos en enzimas importantes, como por ejemplo en la ribulosa 1-5 bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (rubisco), la cual tiene un centro catiónico de  $Mg^{2+}$  que puede ser desplazado en presencia de cationes divalentes como algunos metales pesados.
3. Formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) debido a la autooxidación de metales como  $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$ , lo que resulta en la formación de  $H_2O_2$  y del radical  $^{\circ}OH$ . Este resulta ser uno de los más reactivos que se conocen, por su capacidad de iniciar reacciones en cadena de radicales libres, los cuales ocasionan modificaciones y daño irreversible a compuestos celulares como carbohidratos, ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas y particularmente lípidos (Covarrubias y Cabriales, 2017).

A cualquier concentración, pueden inhibir diversas funciones bioquímicas y como consecuencia, fisiológicas en los organismos vivos. Aunque se ha reconocido a nivel mundial que los metales pesados pueden ejercer efectos adversos para la salud, ya que pueden permanecer por periodos largos de tiempo en el hospedero. La falta de información por parte de los investigadores y de las respectivas autoridades hacia la población en general ha ocasionado que la exposición a éstos continúe en aumento en muchas partes del planeta (Jaishankar et al., 2014).

La contaminación mundial por metales pesados es inmensa debido, preferentemente, al mal manejo que se hace de los residuos y de su liberación al ambiente. En México, se han reportado metales pesados en ríos, lagos, cultivos, suelos y aire de zonas urbanas, así como en ambientes costeros y marinos, donde se ha detectado su acumulación en tejidos de peces y moluscos con alto potencial de consumo humano (Ramos-Arroyo y (Siebe Grabach 2006).

### 3.3 CONTAMINACIÓN POR PLOMO EN MÉXICO.

La minería es una de las principales causas de la contaminación ambiental por metales pesados. Nuestro país ha atravesado por varias épocas de desarrollo, siendo el sector de la minería uno de los principales. Esta actividad se ha centrado en estados que se localizan en la parte centro-norte como Querétaro, Zacatecas, San Luis Potosí, Guerrero y Sonora (Ramos-Arroyo y Siebe-Grabach,2006).

En México se han establecido límites permitidos de metales pesados, así como de arsénico en suelo. Covarrubias mencionó que según la NOM147-SEMARNAT-SSA1-2004 (SEMARNAT 2007) y la NOM-001-SEMARNAT-1996, las concentraciones de plomo permitidas en suelos agrícolas e industriales son 400 y 800 mg/Kg y en agua agrícola y de uso urbano de 0.5 y 0.2 mg/L respectivamente (Covarrubias y Cabriales, 2017). Por otro lado, se ha reportado que, dentro de la República Mexicana, los principales estados en donde impera la contaminación con metales pesados son San Luis Potosí, Chihuahua, Veracruz, Tlaxcala, Zacatecas, Michoacán, Oaxaca y la Ciudad de México (Villalobos, M, et. al, 2009., Covarrubias y Cabriales, 2017., Peregaska, F y Cabrera-Morelos, 1999). México está catalogado como el quinto mayor proveedor de plomo a nivel mundial con una producción de 220,000 toneladas métricas (2013) y una reserva de más de 5.6 millones de toneladas. Tres compañías mineras procesan mineral de plomo en 13 minas ubicadas en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Guerrero, Hidalgo, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora y Zacatecas.

Uno de los principales problemas de la contaminación con plomo fue su uso, por mucho tiempo, como agente antidetonante en la gasolina. En el año 1990, se empezó a eliminar el plomo de este combustible y se inició la utilización de gasolinas libres de plomo. En 1997, se eliminó por completo el metal de la gasolina, sin embargo, este hecho no ayudó a que disminuyera la interacción de los compuestos a base de plomo con los seres humanos (Caravanos et al., 2014).

La exposición con plomo en nuestro país ha sido derivada también por el uso generalizado de la alfarería vidriada. Lo anterior es el resultado de toda una tradición cultural en nuestro país, la cual proviene desde los primeros pobladores, quienes basaban su vida familiar en el uso de utensilios a base de barro y/o cerámica. La elaboración de los mismos fue avanzando hasta dar origen a los utensilios adornados con barnices que les proporcionaban brillo. Este brillo es proporcionado por un compuesto de plomo (óxido de plomo, conocido como greta), el cual es la fuente de este metal en la mayoría de las cocinas rurales o tradicionales mexicanas (Noyola, 2017, Tolentino, 2016). Lo anterior

originó, desde hace ya varias décadas, que se comenzaron a reportar los daños ocasionados en la población de muchos de los estados de nuestro país. La comunidad alfarera está expuesta al momento de esmaltar, también cuando la alfarería vidriada con greta, se utiliza para almacenar, cocinar o servir alimentos ácidos o bebidas calientes; es decir, la exposición al plomo depende del uso, frecuencia y tiempo utilitario de estos objetos (Noyola, 2017).

Desde 1991 se posicionó el uso del plomo en el barro como un tema prioritario de interés y estudio, sin embargo, no se ha podido erradicar su venta y uso en la alfarería popular mexicana sobre todo en estados como Hidalgo, Oaxaca, San Luis Potosí, Morelos y Michoacán, afectando tanto a productores como a consumidores (Tolentino, 2016).

Varios estudios han documentado el impacto en la salud de adultos y niños en México, debido a la fabricación de alfarería vidriada y han reportado concentraciones superiores a 20 µg/dL de plomo en sangre en familias de alfareros en Tzintzuntzan, Michoacán, y de más de 30 µg/dL en una comunidad alfarera del estado de Veracruz.

Como consecuencia de lo anterior, a partir de 1994, la FONART (Fondo Nacional para el Fomento de las Artesanías) ha prestado especial atención al sector alfarero, mediante el Programa Nacional para la Adopción de Esmalte Libre de Plomo, buscando erradicar los trastornos en la salud de los artesanos. Esta institución evaluó el nivel de plomo en sangre de una muestra representativa de artesanos alfareros- Los resultados confirmaron que los niveles de plomo en sangre de esta población rebasaron límites señalados como permisibles en la Norma Oficial Mexicana NOM-199-SSA1-2000 vigente para población no expuesta desde el 2002 (Pérez y Sánchez, 2010).

Hasta el momento se sabe, con base en diferentes estudios, que el riesgo de intoxicación por  $Pb^{2+}$  en los alfareros y sus familias es mayor debido a la suma de factores como la exposición ambiental al metal en sus diferentes formas; el consumo de alimentos cocinados en alfarería vidriada con óxido de plomo; la malnutrición; el uso de la vivienda como espacio laboral; las malas prácticas en el manejo del óxido de plomo y al hecho de que el plomo se ha convertido en una fuente endógena de exposición (Estrada-Sánchez et al., 2016).

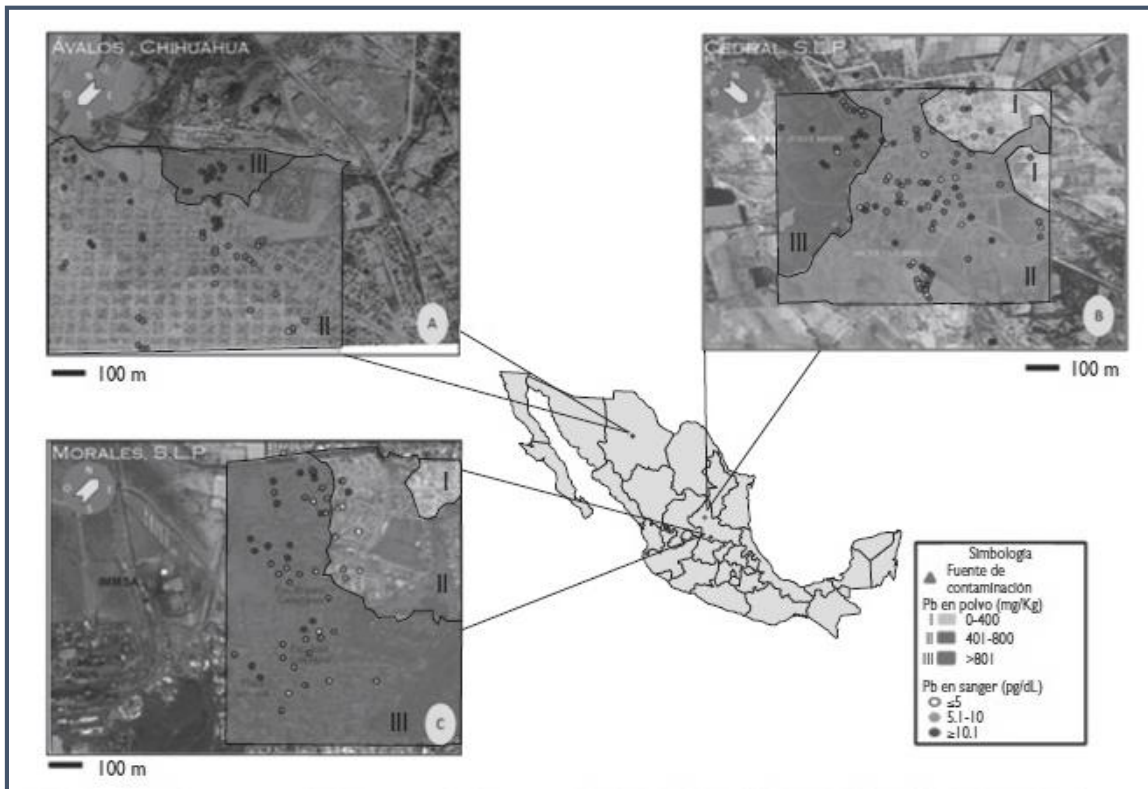
La norma oficial mexicana establece como límite máximo permisible una concentración de plomo en sangre de 10 µg/dL. Algunos estudios han reportado que a concentraciones menores el plomo puede ocasionar daño neuronal en la población infantil (Leal-Escalante et al., 2007). Lo anterior indica que los niños son más susceptibles a la intoxicación con plomo que los adultos por lo cual se puede

establecer una relación entre las características de desarrollo y la toxicidad del metal. Aunado a los dos comentarios anteriores, se deben mencionar otras fuentes importantes de exposición al metal, mismas que se encuentran al alcance de muchos de los niños y jóvenes de nuestro país: los dulces elaborados con utensilios en los que su manufactura haya estado presente el plomo; los juguetes; las pinturas y los cosméticos. Todos estos factores han originado un grave problema de salud especialmente en los niños, en quienes las concentraciones de plomo en sangre indican que cursan por problemas de salud muy serios. Se ha reportado que muchos niños de comunidades rurales de diversos estados de nuestro país han presentado problemas de aprendizaje, desarrollo y crecimiento como consecuencia de su contacto con este metal. Dentro de los primeros se pueden mencionar la deficiencia de atención y la disminución del aprovechamiento escolar. Entre los segundos se encuentran problemas relacionados desde el proceso de gestación hasta el desarrollo post-parto.

**La figura 1** muestra algunas fuentes de contaminación por el metal en niños y jóvenes (Flores-Ramírez, R. et al, 2012). **La figura 2** ilustra los estados más contaminados con plomo en la República Mexicana (Monroy, D., 2014).



**Figura 1.** Fuentes de contaminación por plomo en niños y jóvenes de México (Tomado de Monroy, 2014 y de páginas de mercado libre anunciadas por internet).



**Figura 2.** Zonas de México contaminadas con plomo y en el recuadro la concentración de este metal en sangre determinada en niños (Tomado de Flores-Ramírez, R, 2012).

### 3.4 EFECTOS DEL PLOMO EN EL MEDIO AMBIENTE.

El plomo ha formado parte de la historia a la cual pertenecen los metales más antiguos descubiertos y que han sido utilizados para el beneficio humano. Ello se debe a que dentro de sus propiedades fisicoquímicas se encuentran una alta maleabilidad, gran ductilidad, bajo punto de fusión y una alta resistencia a la corrosión. Estas propiedades han dado lugar a que su uso sea generalizado en diferentes industrias entre ellas la automotriz; la de elaboración de pinturas; la cerámica; la de los plásticos, etc. Como resultado de esto, se ha originado un aumento múltiple en la aparición de plomo libre en los sistemas biológicos como consecuencia de su aumento en el medio ambiente (Kalia & Flora, 2005). La mayor parte del plomo se encuentra distribuido en el aire, bajo la forma de partículas finas. Las formas químicas frecuentes emitidas por las diversas fuentes contaminantes son haluros, óxidos, sulfuros, sulfatos y carbonatos de plomo. Entre estos compuestos, los sulfatos son los compuestos predominantes en el aire (Blanco, 2014) en donde son liberados en forma de gases, vapores o partículas sólidas en donde pueden mantenerse en suspensión a concentraciones superiores a las normales. Dentro de estas partículas las más perjudiciales son las de menor diámetro

ya que son las que poseen mayor capacidad para penetrar al sistema respiratorio, razón por la que se le atribuye su efecto más grave sobre la salud (Environmental Health, 2010).

### **3.5 EFECTOS DEL PLOMO EN LA SALUD.**

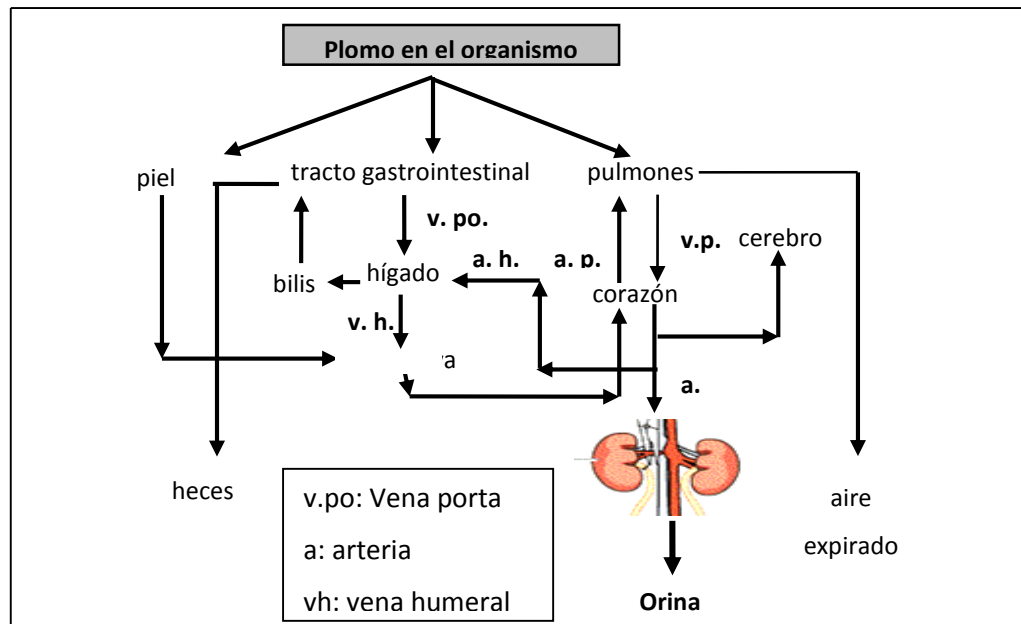
La exposición humana al plomo se produce a través de diversas fuentes como la gasolina, los procesos industriales como la fundición del metal y la combustión del carbón, las pinturas, las tuberías o la soldadura en sistemas de suministro de agua y al reciclaje de baterías, rejillas y cojinetes. Se sabe que el plomo interfiere con una serie de funciones corporales y afecta principalmente al sistema nervioso central, hematopoyético, hepático y renal, produciendo trastornos graves (Patra et al., 2011).

Todos los mecanismos de daño y de efectos adversos en la salud por el plomo están fundamentados en que este metal no tiene ningún papel en las funciones biológicas de los organismos vivos. Los efectos tóxicos del plomo y sus compuestos han sido sujetos a investigaciones en diferentes sistemas animales y vegetales por varios años (World Health Organization, 2009).

La mayoría de los mecanismos de toxicidad del plomo han sido estudiados en diferentes procesos bioquímicos y se ha observado que los aspectos más importantes de estos mecanismos se deben a la perturbación enzimática de muchos procesos celulares. La frecuencia y severidad de los síntomas de la intoxicación con plomo se incrementa en relación de su concentración en sangre en función del tiempo (García, 2010).

La intoxicación puede ser de dos tipos; aguda y crónica. La primera se caracteriza por una exposición a corto plazo a concentraciones altas. En la segunda la exposición es a bajas concentraciones por un periodo de tiempo largo. Los síntomas comunes de envenenamiento agudo son: pérdida de apetito, náuseas, vómito, calambres en el estómago, estreñimiento, dificultad para dormir, fatiga, mal humor, dolor de cabeza, dolores articulares o musculares, anemia y disminución del deseo sexual. Mientras pasa el tiempo se generan daños más graves en el ser humano, los cuales se pueden observar como cambios en las funciones de los sistemas nervioso, hematopoyético, renal y el reproductor (García, 2010). Los daños ocasionados en algunos de estos órganos se detallan a continuación.

La figura 3 muestra un esquema en donde se ilustra la distribución del plomo en el organismo y la interacción entre ellos a través del sistema circulatorio (Navarro, 2004) y posteriormente se detallan los efectos del metal en algunos sistemas.



**Figura 3.** Distribución del plomo en los diferentes órganos comunicados por el sistema circulatorio en los humanos (Navarro, 2004).

### 3.5.1 Sistema nervioso

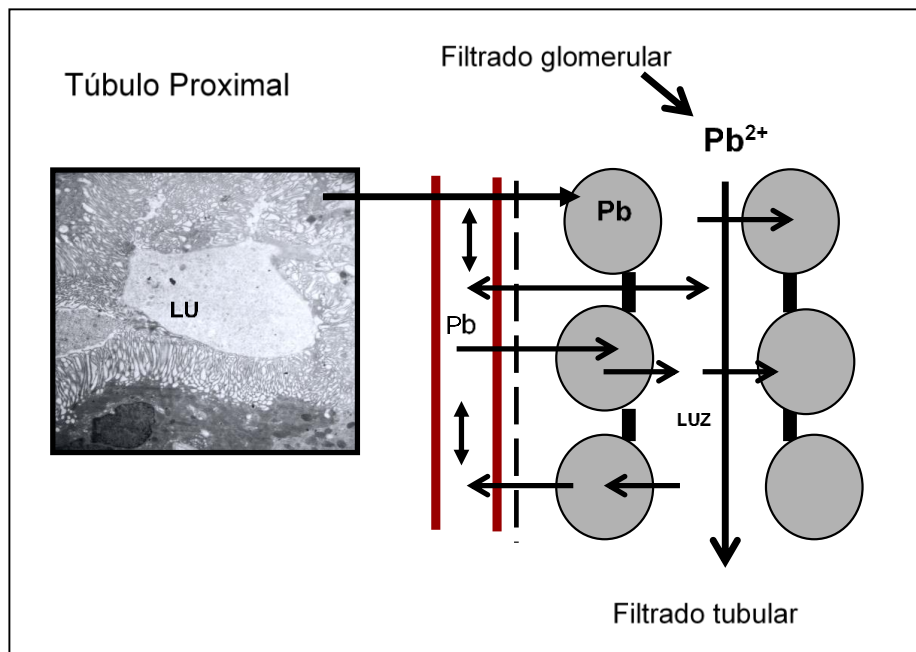
Los efectos tóxicos del metal pueden provocar daños severos cuando el cerebro se encuentra en desarrollo. El plomo puede entrar fácilmente en el tejido neural en desarrollo afectando directamente las neuronas y la sinapsis o, indirectamente, las conexiones neuronales a través de las células gliales. La neurotoxicidad de este elemento puede manifestarse en los niños provocando una disminución del coeficiente intelectual (IQ), o trastornos del comportamiento, de la memoria o del aprendizaje (Chibowska et al., 2016). Tanto el sistema nervioso central como el periférico son afectados por la exposición al metal. Los efectos sobre el sistema nervioso periférico son más pronunciados en los adultos, mientras que los del sistema nervioso central son más prominente en los niños (Brent, 2006; Bellinger, 2004). La encefalopatía es una consecuencia directa de la exposición al plomo y los principales síntomas incluyen molestia, irritabilidad, falta de atención, dolor de cabeza, temblor muscular, pérdida de memoria y alucinaciones.

Las afectaciones sufridas por los niños que presentan mayores niveles de plomo pueden verse reflejadas al presentar retraso en el crecimiento; disminución de la inteligencia, así como de la memoria a corto plazo y la pérdida de la audición. A niveles más altos, el metal puede causar daño cerebral permanente e incluso la muerte (Cleveland et al., 2008). Dentro de las repercusiones también se ha observado neuropatía periférica, lo cual implica reducción de la actividad motora debido a la pérdida de la vaina de mielina, la que tiene como función el aislamiento de los nervios, afectando

seriamente la transducción de los impulsos nerviosos, causando debilidad muscular, fatiga y falta de coordinación muscular (Sanders et al., 2009).

### 3.5.2 Sistema urinario

La acumulación inicial de plomo ocurre en el riñón; ésta toma lugar principalmente por filtración glomerular y subsecuente reabsorción, así como en pequeña medida por absorción directa en la sangre. El plomo puede ser captado por las células epiteliales tubulares renales a través de la membrana basolateral por transporte activo en forma de ion libre (Voslta, 1968; Vander, 1977, 1979; Vicity, 1979). La figura 4 muestra un esquema representativo de estos procesos (Navarro, 2004).

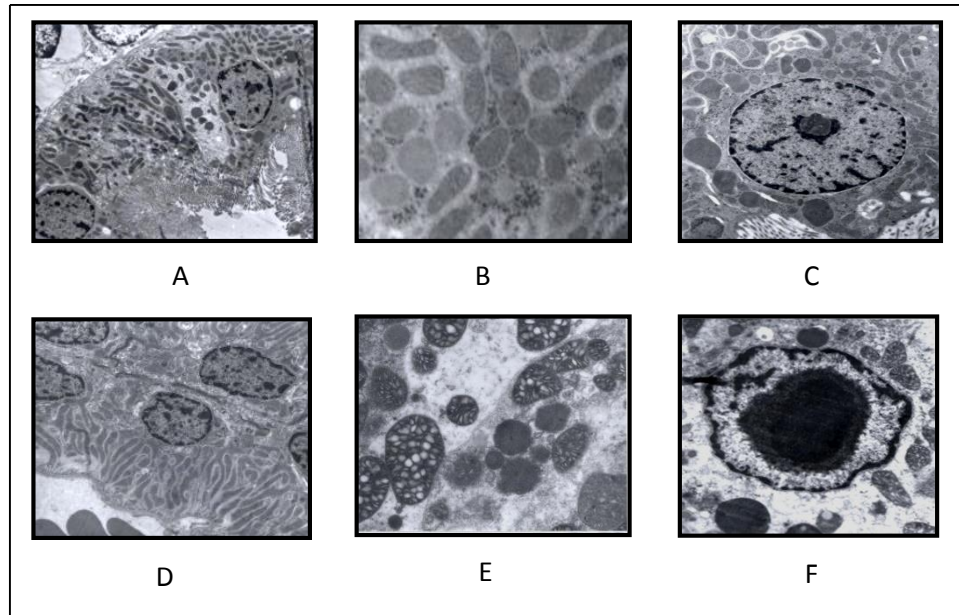


**Figura 4.** Procesos por los cuales el plomo entra a las células renales del túbulo proximal (Navarro, 2004).

La exposición tanto a concentraciones altas ( $> 60 \mu\text{g/dL}$ ) como bajas ( $10 \mu\text{g/dL}$ ) de plomo pueden ocasionar daño renal (Grant, 2008). Se han reportado dos tipos de anomalías en el riñón, ocasionadas por exposición al metal: nefropatía aguda y nefropatía crónica. La primera puede clasificarse morfológicamente a través de los cambios degenerativos presentes en el epitelio tubular

acompañados por la presencia de cuerpos de inclusión intracelulares, formados por complejos entre proteínas y plomo y funcionalmente por la alteración de los mecanismos de transporte localizados en las membranas apicales y basales de las células de los túbulos proximales que conforman a las nefronas corticales y medulares. De acuerdo con (Goyer 1989), los efectos renales del plomo ocurren en tres fases. La fase 1, o fase de exposición aguda, se caracteriza por disfunción tubular proximal, un síndrome tipo Fanconi que consiste en fosfaturia (perdida excesiva de ácido fosfórico por la orina), glucosuria (presencia anormal de glucosa en la orina) y aminoaciduria (presencia anormal de aminoácidos en la orina) y está acompañada por hipofosfatemia (niveles anormalmente bajos de fosforo en la sangre), hiperuricemia (aumento de la concentración del ácido úrico en la sangre) y nefritis intersticial (inflamación del intersticio hístico del riñón, incluyendo los túbulos) (Chisholm, 1962; Goyer, 1971). También ocurren cambios mitocondriales y la formación de cuerpos característicos de inclusión. La exposición crónica puede conducir a la fase 2, la cual se caracteriza por la atrofia progresiva tubular y fibrosis intersticial, donde hay una reducción en la incidencia de cuerpos de inclusión (inciso F de la Figura 5) y la filtración glomerular se ve afectada (Wedeen, 1975; Cramer, 1974). Finalmente, la insuficiencia renal puede ocurrir en esta fase (Goyer, 1971). La fase 3 es caracterizada por neoplasia renal tubular o adenocarcinoma y ha sido observada en ratas expuestas de manera crónica al metal (Van Esch, 1962; Dobryszyccka, 1984).

La figura 5 muestra un juego de fotografías indicando los daños en las células de túbulo contorneado proximal de ratas Wistar expuestas de forma aguda a plomo utilizando un esquema de intoxicación agudo en el cual se administró una dosis cada 48 horas de acetato de plomo en una razón de 25 mg por kilogramos de peso en un periodo de 15 días (Navarro, 2004). En esta imagen se detallan las anomalías mencionadas por Goyer en relación con los efectos que a nivel microscópico se pueden observar en las células renales



**Figura 5.** Cambios morfológicos en riñones expuestos plomo de manera crónica. A, B y C muestran la membrana basal, las mitocondrias y los núcleos de células de túbulo proximal de animales sin exponer al metal y D, E y F los cambios que ocurren en las células de animales expuestos a plomo (tomado de Navarro, 2009).

Hasta hoy en día, no se ha considerado, clínicamente que la exposición a plomo sea el origen de la aparición de proteínas en la orina, sin embargo, se puede pensar que el metal podría originar una secreción no estándar de aminoácidos, fosfatos y glucosa, conjunto de procesos que se conocen como síndrome de Fanconi, el cual es característico de personas con falla renal asociada a la intoxicación por el metal (Salim, 2015).

El contacto de los iones de plomo con varias moléculas intracelulares puede ocasionar estrés oxidativo como mecanismo de toxicidad en el riñón. Además, varios estudios han demostrado que la exposición a plomo podría inducir un aumento de la apoptosis celular no sólo en el hígado, sino también en el riñón (Sujatha et al, 2011). Un estudio demostró que el tratamiento crónico de ratas con acetato de plomo durante un período de 12 semanas aumentó el número de cuerpos apoptóticos en las células tubulares proximales, por lo que se podría pensar que uno de los efectos del metal a nivel celular es su influencia en la expresión génica de las proteínas relacionadas con la apoptosis como las caspasas y algunas cinasas (Finley, 2014; Velaga et al, 2014).

### **3.5.3 Sistema hematopoyético**

También se han observado daños en el sistema hematopoyético tanto en animales como en humanos después de la exposición al plomo. Estos daños incluyen la detección de niveles elevados de porfirinas en orina, entre las que se encuentran el ácido deltaaminolevulínico ( $\delta$ -ALA), coproporfirinas, protoporfirina eritrocitaria y protoporfirina de zinc, como resultado de la inhibición de tres de las enzimas que participan en la biosíntesis del grupo Hemo: ácido  $\delta$ -aminolevulínico deshidratasa (ALAD), ferroquelatasa, y  $\delta$ -ALA sintetasa (ALAS) (ATSDR, 2015). También reduce la vida útil de los eritrocitos circulantes aumentando la fragilidad de las membranas celulares debido al proceso conocido como lipoperoxidación. La combinación de estos dos procesos conduce a la anemia (Cornelis, 2005; Piomelli, 2002).

El efecto del plomo sobre la enzima ALAD es una de las características más estudiadas dentro del fenómeno de la intoxicación con plomo y su inhibición se ha utilizado clínicamente para medir el grado de envenenamiento por el metal. La inhibición de la ALAD da lugar a la acumulación de ácido aminolevulínico, detectable en el plasma y en la orina, incluso a niveles de plomo en sangre inferiores a 10  $\mu\text{g}/\text{dL}$ . Aunque la inhibición de ALAD se observa por primera vez en los niveles de plomo en sangre de 10-20  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , la biosíntesis de hemo no disminuye hasta que la actividad de ALAD es inhibida en un 80-90%, lo que ocurre a una concentración de plomo en la sangre mucho mayor a 55  $\mu\text{g}/\text{dL}$  (Ahamed et al., 2005).

Tal como se ha mencionado en algunos de los párrafos anteriores, el plomo puede afectar el desarrollo de los niños y alterar muchas funciones. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que este proceso de daño se puede generar desde el proceso de la gestación en madres que entran en contacto con el metal de forma directa o indirecta. Debido a lo anterior se procederá a explicar el efecto que el plomo puede tener en el proceso de la gestación y la lactancia.

## **3.6 EFECTOS DEL PLOMO EN LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA.**

### **3.6.1 Gestación.**

Para iniciar el desarrollo de este apartado se explicará cómo es el proceso de gestación y de lactancia en condiciones normales y cómo pueden ser perturbados por la presencia de plomo.

La gestación es un periodo en el cual se está desarrollando una nueva vida. En los mamíferos este proceso se lleva a cabo dentro de la madre, la cual establece comunicación muy especial con el ser que se está formando. Este proceso es complicado y requiere de la participación de muchos procesos bioquímicos y fisiológicos para poder cumplirse. Uno de ellos es la formación de la placenta, la cual es el puente que une a la madre con el hijo.

La placenta es el medio de comunicación existente entre el feto en desarrollo, la madre y el entorno exterior. Las sustancias pueden atravesar la placenta por varios mecanismos de transporte y su función principal es brindar un conducto para la nutrición del feto en desarrollo. La placenta tiene mecanismos que mejoran el transporte de las sustancias que se necesitan y restringe la entrada de aquellas sustancias que son tóxicas. Estos mecanismos están relacionados con influencias hormonales, algunas reacciones oxidativas, en su mayoría no enzimáticas y el flujo sanguíneo fetal. Existen pocos estudios relacionados con el transporte de metales traza esenciales (aparte del calcio y el hierro) así como del transporte transplacentario de metales tóxicos incluyendo plomo, cadmio y mercurio (Goyer, 1990).

De acuerdo al manual (Purizaca-Benites,2008) existen tres mecanismos de transporte de nutrientes en la placenta ejemplo de ello son:

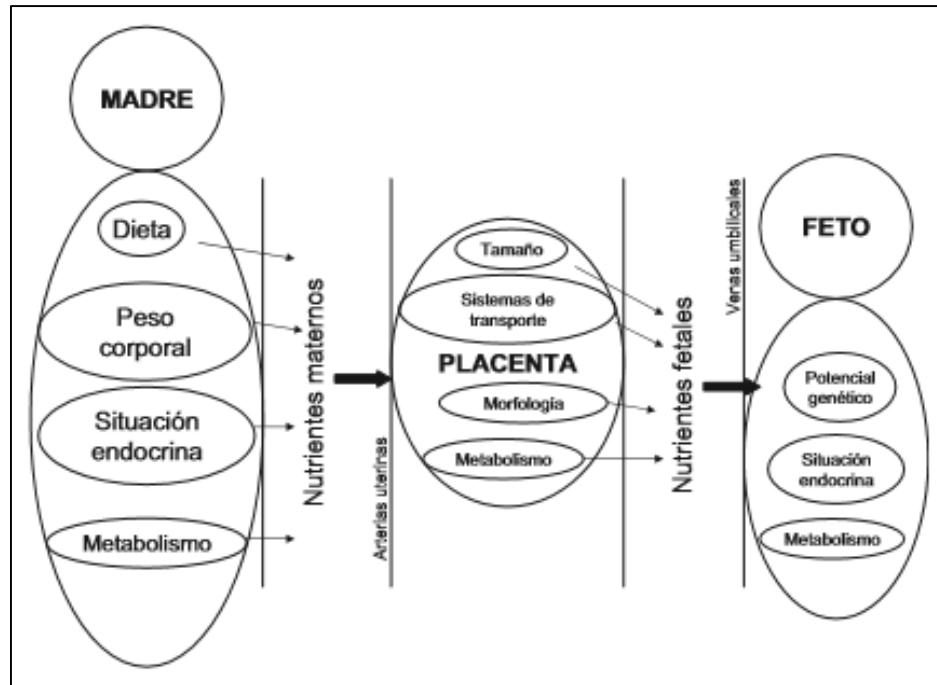
**Difusión simple:** Según las leyes de la biofísica, la concentración de sustancias a los lados de la barrera tiende a igualarse, influyendo en la velocidad de transferencia el tamaño de la molécula, grado de ionización. Las moléculas con peso molecular mayor de 600 Da, no ionizadas, no atraviesan la barrera. Solo pasan con facilidad aquellas moléculas con peso menor de 600 Da. La transferencia por este mecanismo se realiza sin gasto de energía.

**Difusión facilitada:** Coexiste con un componente de difusión simple, pero, aumenta la constante de difusión de la sustancia; tampoco utiliza energía. Por este mecanismo pasa la glucosa de madre a feto.

**Transporte activo:** Esta transferencia se realiza en contra de una gradiente de concentración, con consumo de energía; es un evento sodio dependiente. Así, los aminoácidos, que se encuentran en mayor concentración en la sangre fetal, deben pasar desde la sangre materna en contra de esta gradiente; la tasa de recambio de proteínas y de los diferentes aminoácidos en las proteínas de la placenta y tejidos fetales es mayor a la de los tejidos maternos.

La figura 6 muestra que existen factores propios de la madre, la placenta y el feto implicados en el transporte de sustancias. En la madre se deben considerar la dieta, el peso, el metabolismo y el estado

hormonal. En la propia placenta influyen el tamaño de la misma, los sistemas de transporte, la morfología y el metabolismo. Finalmente, los factores que se relacionan con el feto son el potencial genético, la situación endócrina y el metabolismo.



**Figura 6:** Transporte de nutrientes en la placenta reportada (Cetin,2010).

Dentro de los nutrientes que se transportados por la placenta se encuentra la glucosa, considerando a este nutriente el más importante y esencial para el crecimiento fetal, la manera en que es transportada de la madre al feto es por medio de un sistema de difusión facilitada, y su concentración fetal es constantemente menor y dependiente de la concentración materna y la edad gestacional (Powell,2006).

Los aminoácidos son transportados por portadores activos, en particular los aminoácidos neutros, por medio de un sistema de transporte dependiente del sodio, mientras que los aminoácidos ramificados, como la fenilalanina y lisina, son vehiculizados por un transportador independiente del sodio (Cetin I, de Santis MS, ,2005). Durante el proceso del embarazo, las concentraciones fetales de aminoácidos son constantemente superiores a las de la madre (Cetin I, Ronzoni S, Marconi,1196).

Se han realizado estudios usando isótopos estables y con ello se ha demostrado que los aminoácidos no esenciales fetales derivan principalmente de la producción placentaria a partir de aminoácidos metabólicamente relacionados.

Se sabe que la placenta es un detector de nutrientes capaz de modificar su función de transporte con arreglo al suministro materno de nutrientes y las necesidades fetales. Los ácidos grasos pueden atravesar la placenta en forma de ácidos grasos libres por difusión simple o como lipoproteínas que conectan con proteínas de unión específica y son liberados a continuación por medio de lipoproteinlipasas placentarias específicas (Herrera E, Amusquivar, 2006). La difusión simple acontece por la presencia de un gradiente de concentraciones materno fetales. La concentración fetal es constantemente menor que la materna, pero también cualitativamente diferente; los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL), como el ácido araquidónico y el ácido docosahexaenoico, están presentes en mayores proporciones en comparación con sus precursores, ácido linoleico y ácidolinoléico (Crawford MA, ,2008).

### **3.6.2 Lactancia**

La lactancia materna de primera estancia constituye un proceso por medio del cual se provee el alimento ideal para un recién nacido. De manera exclusiva, la leche materna, aporta todos los nutrientes necesarios para su desarrollo durante los primeros seis meses de vida. Al ingerir leche materna los beneficios para el menor son innumerables, pero también lo son para la madre y el medio ambiente. Sin embargo, la leche también constituye un vehículo para el paso de sustancias tóxicas al niño.

El transporte de nutrientes a través de la lactancia inicia desde la gestación a partir de la semana 16 cuando se comienza a formar el precalostro, la leche producida en esta etapa es rica en proteínas, nitrógeno total, inmunoglobulinas, magnesio, hierro, sodio y cloro. Debido a que los recién nacidos prematuros tienen baja actividad de lactasa las concentraciones de lactosa son bajas (Schanler et al., 1989; Aguayo, 2001; García-López, 2011).

Pasando 4 días después de la gestación se produce el calostro, este es una leche de transición que en esta etapa apenas comienza a formarse. Se producen de 2 a 20 mililitros por toma en los primeros 3 días postparto, siendo esta cantidad suficiente para cubrir las necesidades del neonato. La apariencia es de color amarillento por la presencia de  $\beta$ -caroteno y provitamina A que es liposoluble (Lawrence & Lawrence, 2007). Tiene mayor cantidad de proteínas (97% en forma de inmunoglobulina A),

vitaminas liposolubles, lactoferrina, factor de crecimiento, lactobacilos, oligosacáridos, sodio (que le confiere un sabor salado) y zinc. En menor concentración se encuentran las grasas, la lactosa y las vitaminas hidrosolubles (Manotas, 1994; Aguilar Cordero, 2005; Reyes Vázquez, 2011). El calostro protege al recién nacido ya que le transfiere inmunidad pasiva por absorción intestinal de inmunoglobulinas, linfocitos y macrófagos, posee altas concentraciones de lisozima (Ho et al., 1979; Uruakpa et al., 2002) y gran cantidad de oligosacáridos (20g/L) y lactobacterias; la motilina que posee, ayuda a la expulsión de meconio al aumentar el peristaltismo intestinal (Lawrence & Lawrence, 2007).

Al culminar el proceso de gestación una reacción característica de los alvéolos es que en el interior presentan una sustancia que se compone de células epiteliales descamadas y leucocitos en las que se puede detectar lactosa en sangre y en la orina lo que se corrobora como la síntesis de lactosa en las glándulas mamarias (Kuhn 1977; Cox 1999). En la mayoría de las mujeres ocurre que la excreción de lactosa por la orina comienza entre las 15 y 20 semanas de gestación. A la capacidad de las mamas de poder sintetizar los componentes de la leche se le denomina Lactogénesis (Cregan, 1999).

Estudios han revelado que en el embarazo también se presentan concentraciones de prolactina en el plasma, lo que indica que esta sustancia tiene un papel importante en la diferenciación celular y en la formación de galactocitos o células secretoras en el desarrollo de la mama durante la gestación. Al mismo tiempo también se presenta un cambio, que es aumento de volumen de la mama que se relaciona con el incremento en las concentraciones del lactógeno placentario plasmático. El cambio en el crecimiento del pezón se relaciona con el nivel de prolactina y el crecimiento de la areola con el nivel de lactógeno placentario (Cox 1999). Al término del embarazo, se observa un aumento de volumen de la mama de entre 20 a 227 ml. En algunas mujeres, al progresar el desarrollo glandular, los depósitos de grasa localizados en las mamas pueden movilizarse y en ese caso puede que no se aprecien estos cambios de volumen (Cox, 1999).

### **3.7 EFECTOS DEL PLOMO EN LAS MADRES EMBARAZADAS EN MEXICO Y OAXACA.**

El problema radica en que el metal se puede liberar hacia el torrente sanguíneo, en especial durante los procesos de embarazo, la lactancia y el climaterio, colocando en riesgo a las mujeres y a sus hijos, ya que el plomo cruza fácilmente la barrera placentaria, siendo ésta el medio por el que el feto recibe los nutrientes necesarios para su desarrollo (Martínez y colaboradores, 2001). En el año 2009 se

reportó que el plomo puede tener un efecto dañino en el sistema endócrino. El nivel sanguíneo de plomo materno puede aumentar el riesgo considerable de muerte fetal y de alteraciones neurológicas en los recién nacidos. Mujeres en proceso de gestación con niveles elevados de plomo en la sangre presentan un riesgo mayor de partos prematuros, abortos espontáneos, muertes fetales y de recién nacidos con peso bajo para su edad *gestacional* (Rothenberg1993)

Se ha demostrado que los niños con altos niveles de plomo en sangre presentan un desempeño más bajo en la escuela. Lo anterior fue determinado utilizando pruebas psicométricas, mediante las cuales se pudo demostrar que los niños que se encontraban en contacto con el tóxico presentaron un rendimiento escolar menor y además de un desarrollo intelectual deficiente en comparación con aquellos estudiantes que tenía niveles bajos de plomo en sangre (Azcona-Cruz, 2000).

En el estado de Oaxaca, se ha reportado que los niños expuestos a plomo pueden presentar disminución del crecimiento físico (bajo peso al nacer, déficit de talla), disminución del coeficiente intelectual, disminución de agudeza auditiva, daño renal, hipertensión, anemia, osteoporosis. Entre la población de alto riesgo están las mujeres embarazadas (en donde se ha observado una disminución en la tasa de fertilidad) y los niños menores de edad (González, 1999). Terrazas y colaboradores estudiaron el efecto del uso de losa de barro y su asociación con las concentraciones de plomo en sangre en niños del estado de Oaxaca. Los resultados indicaron que, en las zonas rurales, más de la mitad de los niños presentaron niveles de plomo por encima de 10 µg/L. Este hallazgo fue asociado con el uso de cerámica vidriada en la zona de estudio. Los autores sostienen que México es el cuarto país en producción de plomo y que, aun cuando se han implementado medidas para reducir las fuentes potenciales de exposición.

Con el paso del tiempo, se sigue observando que la intoxicación por este metal en niños continúa siendo un problema de salud pública (Terrazas y colaboradores, 2015). De la misma manera se ha constatado que, en Oaxaca, la mayoría de los niños menores a los seis años de edad han estado en contacto con juguetes manufacturados o contaminados con plomo y que, de la misma manera, su exposición al tóxico aumenta cuando el niño constantemente se encuentra masticando sus juguetes o estos se encuentran en contacto con su boca (Vásquez, 2017). Todos estos estudios ponen de manifiesto que en el tiempo presente y como resultado del mal manejo de los recursos y los desperdicios generados de los mismos, existe ya una concentración de plomo en el aire, suelo y el

agua a tal grado que ha llegado a formar parte de los seres vivos, sus órganos y sus células al ser transportado por la sangre de los habitantes (particularmente de los niños) de ciudades y comunidades rurales. También se tiene bien conocido que son los niños quienes retienen mayor cantidad de plomo durante el período en el cual sus cerebros y capacidades intelectuales están en una etapa muy importante de su desarrollo (la etapa gestacional) (Burger, 2010).

Se ha informado que la acumulación de plomo en el organismo humano afecta a la mayoría de las glándulas endocrinas. En particular tiene un efecto sobre el eje hipotálamo-pituitaria provocando respuestas de las hormonas estimulantes de la tiroides (TSH), somatotropina (GH), folículo estimulante/luteinizante (FSH/LH), tirotropina (TRH), somatocrinina (GHRH), y la estimulación de gonadotropina (GnRH). De la misma manera se han reportado niveles elevados de prolactina (PRL) en la intoxicación por plomo (Doumouchtsis, 2015).

Se sabe que uno de los factores exógenos que dañan el desarrollo neuroconductual de los niños es la exposición intrauterina al plomo. Durante las primeras etapas del desarrollo prenatal el cerebro es afectado debido al hecho de que los seres humanos comienzan a acumular plomo en sus cuerpos y éste afecta el desarrollo neuroconductual de los niños en el desarrollo prenatal. De esta manera cuando los fetos se encuentran expuestos al metal pueden presentar diversas alteraciones, principalmente en el cerebro, ya que esta etapa es de crecimiento rápido. Los efectos del plomo radican en el deterioro de la función cognitiva dado que la placenta no representa una barrera biológica para el metal (Wieslaw, 2009).

El grupo de Navarrete-Espinoza estableció, en el año 2000, que existe una relación entre el nivel de plomo sanguíneo materno (PSM) y el existente en la sangre del cordón umbilical (PSC) al momento del parto. Este dato se utilizó para identificar los principales predictores del PSM en derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en el Distrito Federal, siendo la loza vidriada el principal. El consumo de leche y jugo de naranja se asociaron inversamente con el PSM. Estos estudios también mostraron que 47% de las madres y 50% de los niños tuvieron valores superiores a 10 µg de plomo por decilitro de sangre y que 578 recién nacidos se registraron niveles de plomo superiores a los de la madre. Existen estudios que relacionan la intoxicación con plomo y el riesgo de abortos espontáneos, indicando que estos casos se presentan cada vez más en zonas con niveles altos de contaminación con el metal. En múltiples estudios de laboratorio, el plomo ha sido reconocido como

una sustancia genotóxica y teratogénica y se ha demostrado que la severa exposición ocupacional a este podría aumentar el riesgo de aberraciones cromosomales e inducir teratozoospermia (alteraciones morfológicas en los espermatozoides) en individuos expuestos (Navarrete-Espinosa, 2000).

En este trabajo de Tesis después de haber terminado la gestación y el parto se permitió que las ratas madre amamantaran a las crías durante un mes ya que se sabe que existe una correlación entre las concentraciones de plomo en leche materna con niveles de plumbemia en los recién nacidos y sus madres. Esto demuestra que la leche materna podría ser una fuente importante de contaminación para el neonato. También se conoce que hay una correlación entre la presencia de plomo en leche materna y plumbemia en el recién nacido; sin embargo, no se cuenta con estudios que hayan determinado la proporción exacta de plomo absorbido por lactancia ni una razón de proporciones entre la concentración en sangre y leche materna.

La presencia de plomo puede generar muchos efectos en el sistema endócrino en general y en los procesos de gestación en particular. Se han establecido diversos indicadores de daño, los cuales sirven para dar una idea general de los efectos de los agentes tóxicos en los seres vivos. A nivel celular muchos de los indicadores son enzimas, cuya expresión o actividad se modifica como resultados de los procesos tóxicos de muchos agentes contaminantes. En este trabajo se utilizará la actividad de la enzima Glutación S-transferasa como indicador de daño en el modelo usado en este trabajo. Dentro del grupo de investigación de Bioquímica de la Universidad del Papalopan se han realizado estudios en los que se ha evaluado el papel de la actividad de la enzima en función de la exposición a plomo y la generación de estrés oxidativo en ratas Wistar macho. Se encontró una relación evaluada tanto de forma experimental como quimiométrica (Hernández, 2015). En base a los resultados obtenidos se cuantificó la actividad de esta enzima, la cual se describe a continuación.

### **3.8 ENZIMA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN LA SUSCEPTIBILIDAD HACIA AGENTES TÓXICOS.**

Las Glutación S-transferasas (GST) constituyen un grupo de enzimas diméricas que desempeñan un papel crítico en la defensa contra productos de estrés oxidativo y varios compuestos electrofílicos en la fase II del metabolismo de los xenobióticos, catalizando la conjugación de glutatión reducido con sustancias genotóxicas potenciales (He et al., 1998). Varios estudios han demostrado que las diferencias individuales en la actividad de GST son el resultado del polimorfismo genético de estas

enzimas (Cao et al., 2017). Este grupo de enzimas son productos de una superfamilia de genes, algunos de ellos polimórficos debido a los alelos eliminados o mutados (Blackburn et al., 2000).

Esta familia se encuentra ampliamente distribuida en los seres vivos y se expresan en muchos tejidos de mamíferos en forma específica y en función del tipo de tejido y de célula (Thiagara et al., 2005). Muchos estudios han demostrado evidencia de variaciones individuales en la expresión de GST en diferentes tejidos (Laguna-Ruiz et al., 2005). Además de los tejidos de mamíferos, la enzima se encuentra en especies de diferentes reinos, lo cual la hace poseedora de un papel muy importante dentro de los diferentes organismos que la poseen.

El presente trabajo de Tesis se relaciona con el plomo y sus efectos en ratas gestantes, tema que ha sido poco estudiado en humanos y en animales de laboratorio. Con relación a esto se han encontrado varios reportes que indican que el metal puede ocasionar daño tanto a los fetos como a sus madres durante y después del proceso de gestación.

Con el objetivo de explorar sobre los conocimientos y reportes relacionados con este tema, a continuación, se escribe una cronología de trabajos relacionados con el efecto de la exposición a plomo en el proceso de gestación y en niños recién nacidos o pequeños cuya madre estuvo expuesta a diferentes concentraciones de metal. Se han detectado pocos trabajos en modelos animales por lo cual se describen también los que se han podido obtener en la literatura.

En 1979 Wide realizó una serie de experimentos en ratones expuestos a 75 ppm de cloruro de plomo. La administración fue llevada a cabo el día 4 de gestación y a los días 5 y 6 se determinaron las superficies luminales uterinas y se observó que el metal pudo interferir con la actividad de las hormonas esteroideas en el endometrio, por lo cual se observó que el proceso de gestación se vio interrumpido en presencia de plomo (Wide,1979).

En 1987, Lauglin realizó estudios en hembras de monos Rhesus a las cuales expuso a la ingesta diaria de acetato de plomo en el agua de bebida. El periodo de intoxicación duró 8 años. El plomo ingerido fue determinado en sangre y se encontraron niveles de 44 a 89  $\mu\text{g}/\text{dL}$  de sangre. Los animales no presentaron signos de intoxicación por plomo durante el periodo de intoxicación, medido ello como el apetito, el peso corporal y los niveles de hematocrito. Los ciclos menstruales si fueron alterados y se observó que a partir de los dos años de ingesta de plomo los periodos menstruales comenzaron a

disminuir y se observó una tendencia a presentar menopausias prematuras. Sin embargo, los animales no mostraron ningún otro signo de intoxicación por el metal (Lauglin, et. al, 1987).

Foster en 1992 estudió el efecto de la exposición a acetato de plomo a una concentración de 1500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , desde el nacimiento hasta los 10 años de edad, en forma de cápsula vía oral, en la función menstrual y la circulación de las hormonas folículo estimulante, estradiol y progesterona en hembras de monos *nalliparous cynomolgus*. Después del tiempo de exposición, los niveles de plomo en sangre encontrados fueron de 35  $\mu\text{g}/\text{dL}$ . Este investigador encontró que los ciclos menstruales y la salud de las hembras no fueron alterados durante el periodo de intoxicación, pero si disminuyó la concentración de las hormonas estudiadas (Foster, 1992).

Hallén y colaboradores (1995) estudiaron los efectos de la exposición placentaria y de lactancia al plomo en ratas lactantes después de la exposición a largo plazo de ratas madre al metal en el agua potable. La exposición continua al metal durante la gestación y la lactancia dio como resultado niveles de este elemento en la leche aproximadamente 2.5 veces más altos que los niveles del ión en sangre. Cuando terminó la exposición a tóxico en el parto, los niveles en la leche eran similares a los encontrados en sangre en el día 15 de la lactancia, y solo el 10% de los niveles de leche encontrados después de la exposición continua al metal. La exposición a través de la placenta y la leche en la descendencia de las ratas expuestas continuamente dio como resultado niveles en sangre y cerebro 6 veces mayores que en la descendencia expuesta solo a través de la placenta. La exposición solo por la vía lactante en las crías de las madres expuestas a plomo hasta el parto originó niveles del tóxico en sangre más altos que en las crías expuestas solo a través de la placenta. Todo lo anterior indica que la transferencia a través de la leche materna es considerablemente mayor que la transferencia placentaria. Además, determinaron que en la descendencia de los grupos expuestos disminuyó la actividad de ALAD en la sangre, lo que indicó una relación entre la actividad de la enzima y los niveles de plomo en sangre, en la cual la actividad es inhibida de forma proporcional a la concentración del tóxico. Sin embargo, no observaron ningún efecto en la calidad de la leche, medida por las concentraciones de lípidos, proteínas y calcio de la leche, ni en la producción de leche (Oskarsson et al., 1992; Hallén y Oskarsson, 1993; Gulson et al., 1998). Un estudio ha indicado que el plomo posee gran afinidad por grupos sulfhidrilo y carboxilo de la caseína de la leche, razón por la cual se podría explicar su toxicidad en animales o humanos lactantes (Srinivas,et al.,2007).

En el año de 1997, un estudio en mujeres que tuvieron a sus hijos demostró que los niños nacidos tuvieron bajo peso. En relación con ello se ha demostrado que el peso al nacer es un buen predictor de la supervivencia y el desarrollo de los niños. Niveles altos de plomo en personas expuestas ocupacionalmente se han asociado con alteraciones adversas en el nacimiento incluyendo algunas alteraciones cognitivas y alteraciones a nivel de hueso como la tibia. El peso y longitud de la tibia se ha asociado de forma inversa a los niveles de plomo en el cordón umbilical en los niños recién nacidos, representando un problema grave a nivel óseo (González-Cossio, 1997). Observaciones similares en mujeres de Taiwan han sido observadas, nueve años después, por un grupo de investigadores de dicho país, quienes también relacionan el peso al nacer con la exposición a plomo en madres (Pau-Chung, et. al., 2006).

Torres-Sánchez escribió en 1998 que el plomo es un metal que puede cruzar la placenta, por lo que el feto se encuentra expuesto a concentraciones similares de metal que la madre. El plomo en sangre de la madre se debe a factores endógenos y exógenos. Dentro de los primeros la movilización de plomo de los huesos puede producir altos niveles del metal en sangre. Los conocimientos sobre la exposición prenatal a plomo y los nacimientos antes de término son inconsistentes. Algunos estudios muestran una relación entre ambos factores y otros estudios no los mencionan como algo relevante. En México, la exposición a plomo representa un grave problema de salud que tiene su origen en el uso de la cerámica vidriada para cocinar y guardar alimento. En 1993 se determinó que el 40% de los recién nacidos presentaron niveles mayores a 10 µg/dL del metal en el cordón umbilical, indicando que sus madres fueron expuestas a altas concentraciones de metal durante el embarazo. Un trabajo realizado con mujeres no expuestas ocupacionalmente dio a conocer que la exposición al metal afectó mayormente a mujeres que han parido por primera vez y que sus partos fueron antes de las 37 semanas de gestación, presentando cantidades iguales o mayores a 5.1 µg/dL en el cordón umbilical. Lo anterior se puede explicar asumiendo que el plomo depositado en el hueso fue removido durante el embarazo, distribuido por sangre y depositado en diversos órganos y en el cordón que une a la madre con el feto (Torres-Sánchez, 1998).

Un año después el mismo autor junto con sus colaboradores llevaron a cabo un estudio en mujeres de la Ciudad de México. en este trabajo se determinó el riesgo de parto prematuro con los niveles de plomo en sangre. Como resultado se detectaron 419 nacimientos a término y 161 nacimientos

prematurados antes de las 37 semanas. Los niveles de plomo fueron más elevados en las mujeres con parto prematuro que en las que tuvieron un parto a tiempo ( $9.77 \pm 2.0$  vs  $8.24 \pm 2.15$   $\mu\text{g}/\text{dL}$ ). Se observó que la incidencia de partos prematuros fue mayor en mujeres que presentaban niveles de plomo en el cordón umbilical mayor a  $5.1$   $\mu\text{g}/\text{dL}$ . Este hecho no fue observado en mujeres multíparas, por lo cual los autores indicaron que la exposición intrauterina a plomo puede estar asociada al parto prematuro en mujeres primíparas que en multíparas (Torrez-Sánchez, 1999).

Curros, en 1999 reportó que el transporte transplacentario de plomo es conocido desde principios de siglo y que el metal es capaz de depositarse en los huesos de la madre gestante de forma proporcional al avance del embarazo. Este depósito puede representar hasta el 90% del plomo ingerido por vía oral. De igual forma indicó que los órganos en los que también se deposita el metal son el hígado, el riñón y el cerebro. Una vez que el plomo ingresa al organismo de una mujer en proceso de gestación es hasta las 12 o 14 semanas que el ión puede atravesar la placenta y aumentar su concentración en los tejidos fetales, además de iniciar el proceso de acumulación en la leche materna (Curros, et. al., 1999).

El grupo de Navarrete-Espinoza estableció, en el año 2000, que existe una relación entre el nivel de plomo sanguíneo materno (PSM) y el existente en la sangre del cordón umbilical (PSC) al momento del parto.

En 2002, Margarita Rivera, trabajadora de los servicios de Salud de Oaxaca reportó que en México existe un largo historial de intoxicación por plomo el cual incide principalmente en la salud de los niños y su desarrollo neuroconductual, así como a trabajadores de industrias con alto índice de exposición al tóxico. En el año 1999 se publicó la Norma Oficial Mexicana de Emergencia de Salud Ambiental, donde se establecieron los criterios para la determinación de plomo en sangre, y las acciones para proteger la salud de la población no expuesta ocupacionalmente y los métodos de prueba. El valor aceptable de plomo en sangre en niños y mujeres embarazadas aceptado es de  $10$   $\text{mg}/\text{dL}$  y  $25$   $\text{mg}/\text{dL}$  en adultos. Ella indicó que los niveles de Pb en sangre que en algún tiempo se consideraron seguros, se han asociado con déficit del coeficiente intelectual (CI), trastornos del comportamiento y retardo en el crecimiento. Manifestó la neurotoxicidad del plomo es más crítica para el feto en desarrollo y el niño en crecimiento que para los adultos debido a que la vida media biológica del metal es mayor en niños que en adultos. De la misma forma dio a conocer que estudios realizados en 100 mujeres embarazadas en los hospitales del Centro Médico Nacional "La Raza", de Inguarán y de Cuautitlán,

registraron diversos tipos de alteraciones ginecológicas, así como problemas en el parto, sobre todo de aquellas que tenían concentraciones de metal de hasta 400 mg/dL en sangre.

En casos como este pueden nacer fetos anencéfalos, con alteraciones en el desarrollo cerebral o con deficiencia mental. En los lactantes y niños pequeños, los síntomas asociados a la intoxicación por plomo son: irritabilidad, dolor abdominal, ataxia, crisis convulsivas y/o pérdida de conocimiento, deficiencia en el aprendizaje, hiperactividad y lapsos de atención reducidos, así como conducta agresiva.

En la madre es frecuente la hipotensión arterial. Enfatizó que la intoxicación en niños pequeños es grave, sobre todo antes de los cinco años ya que puede haber encefalopatía mortal y en los sobrevivientes secuelas neurológicas permanentes. Este metal produce alteraciones importantes en la inteligencia, provocando una disminución de 8 puntos en el coeficiente intelectual al incrementarse los niveles de plomo sanguíneo de 10 a 35 mg/dL (Rivera, 2002).

En México se tiene el conocimiento de que el plomo constituye un factor de riesgo para aborto espontáneo, bajo peso al nacer, la disminución del perímetro cefálico y la inhibición del desarrollo cognoscitivo. En relación con el periodo de gestación, existen estudios toxicológicos en animales, en los que se han documentado efectos sobre la implantación del óvulo, la supresión subclínica de las concentraciones circulatorias de la hormona luteínica, la foliculo estimulante y estradiol, sin producir signos visibles de irregularidad menstrual; alteraciones persistentes en el ciclo menstrual e incluso, probablemente, una menopausia prematura. Se ha descrito una posible asociación entre las concentraciones del metal y los efectos adversos en el sistema reproductor, específicamente trastornos menstruales y amenaza de aborto en mujeres expuestas. La relación entre los efectos del plomo y el tiempo requerido para quedar embarazada (TRE) son controvertidos y están principalmente enfocados a parejas con esposos ocupacionalmente expuestos. En la actualidad, las investigaciones relacionadas con el TRE se consideran puesto que los efectos de la exposición a este contaminante podrían interferir con el proceso biológico del embarazo y disminuir la fecundidad entre mujeres expuestas (Guerra-Tamayo, et. al, 2003).

En 2007 el grupo de Espliegues, indicó que los fetos y los niños, en comparación con los adultos, presentan una vulnerabilidad especial a los tóxicos ambientales debido a su inmadurez fisiológica y

más tiempo de vida después de la exposición. Además, para el caso de los contaminantes atmosféricos, hay que considerar que los niños inhalan un volumen de aire relativamente mayor que los adultos y suelen pasar más tiempo al aire libre. La mortalidad intrauterina, perinatal o neonatal constituye el efecto más ampliamente estudiado (Espliegues, et. al, 2007).

Poma en 2008 reportó que la inmadurez fisiológica de fetos e infantes (de hasta 36 meses) puede aumentar el riesgo de que el plomo penetre el SNC, lo que puede originar alteraciones neurológicas permanentes. Indicó que los signos y los síntomas de la intoxicación por plomo dependen del tipo de exposición al mismo (exposición muy baja, leve, moderada y alta) ocasionando desde pérdida de memoria hasta alteraciones de la conciencia. Cuando el plomo interactúa con el sistema reproductor puede ocasionar aumento en la proporción de espermatozoides anormales y disminución en la cuenta de espermatozoides normales. No se sabe si el plomo a niveles bajos afecta el desarrollo de los embarazos, sin embargo, estudios realizados con mujeres embarazadas que han vivido cerca lejos de fundiciones han demostrado un aumento de abortos espontáneos; muertes fetales y partos prematuros en las primeras. Durante el embarazo, el plomo entra libremente al compartimiento fetal, por lo que afecta la viabilidad fetal y el desarrollo del niño durante la vida extrauterina. A niveles bajos (14µg/dL) la exposición a plomo puede aumentar el riesgo de sufrir partos prematuros y de recién nacidos con peso menor al esperado. Se han observado anomalías congénitas, con testículos no descendido y complicaciones de la piel (Poma, et. al., 2008).

Estudios en Aguascalientes, México demostraron que los metales plomo y cadmio son capaces de atravesar la membrana placentaria. Su presencia se asocia a riesgos perinatales como malformaciones congénitas, parto prematuro y disminución del peso al nacer. A su vez, manifestaron que ambos metales pueden interferir en el transporte de sustancias nutritivas y que, dado que el buen funcionamiento placentario es indispensable para la producción del líquido amniótico (LA), la disminución de éste (oligoamnios) puede ser resultado de la presencia de estos metales pesados en el tejido placentario. Esto dará origen al aumento de las concentraciones de plomo en condición de oligoamnios, así como disminución del peso al nacer (Terrones, et. al, 2008).

En relación con el proceso de la gestación, se sabe que la placenta constituye el medio de comunicación existente entre el feto, la madre y el entorno. Su función principal es la de proporcionar un conducto para la nutrición del feto en desarrollo. Las diferentes sustancias pueden atravesar la

placenta por varios mecanismos de transporte. Estos mecanismos están regulados por varias acciones hormonales; algunas reacciones oxidativas, en su mayoría no enzimáticas y por flujo sanguíneo fetal. Existen pocos estudios relacionados con el transporte de metales traza esenciales (aparte del calcio y el hierro) así como con el transporte transplacentario de elementos teratogénicos como plomo, cadmio y mercurio. Cuando los fetos se encuentran expuestos a los metales mencionados anteriormente, se pueden presentar diversas alteraciones, principalmente en el cerebro. En el caso del plomo, sus efectos radican en el deterioro del desarrollo y la función cognitiva dado que la placenta no representa una barrera biológica para este metal (Wieslaw, 2009).

En Buenos Aires un grupo de investigación reportó que el feto y el niño son particularmente vulnerables a las exposiciones a contaminantes ambientales en los primeros años de vida. Ellos explican que lo anterior se debe a las ventanas críticas de vulnerabilidad que ocurren durante el periodo de rápido crecimiento que pueden interrumpir el normal crecimiento de órganos y sistemas. Lo anterior, reportaron, se complica por la menor capacidad de detoxificación debido a que los mecanismos metabólicos no se encuentran totalmente desarrollados. De manera adicional reportaron que la exposición a contaminantes ambientales es responsable del 36 % de las muertes de los niños a lo largo del planeta. Según la Organización Panamericana de la Salud, aproximadamente 100, 000 niños menores de 5 años mueren anualmente en América por esta causa (Lutz, et. al, 2010).

La relación entre la intoxicación con plomo y la gestación ha sido poco estudiada ya que se ve influenciada directamente por el sistema endócrino. Lo anterior provoca que el establecimiento de modelos de estudio se vuelva complicado y que mucho del conocimiento que se tiene se haya adquirido a partir de los casos clínicos que se han reportado. Se sabe, sin embargo, que los daños ocasionados por la exposición a plomo, a nivel endócrino, se relacionan con el funcionamiento de las glándulas, la acción o producción de hormonas y el desarrollo embrionario (Dolores, 2013).

Existen estudios que relacionan la intoxicación con plomo y el riesgo de sufrir abortos espontáneos en zonas con niveles altos de contaminación con el metal. Un ejemplo lo constituye el estudio de Castro-Bedriñana y sus colaboradores quienes determinaron los efectos del plomo en gestantes y neonatos de madres expuestas al metal en la Ciudad de la Oroya en Perú. Los datos se muestran en la tabla 1 (Castro-Bedriñana, 2013).

**Tabla 1.** Niveles de plomo en sangre umbilical y sus efectos en la salud en 40 individuos. (Modificado de Castro-Bedriñana et al., 2013)

Nivel de plomo ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )	Número de individuos	Efectos
< 10	13	Audición y crecimiento
10 - < 20	8	Coficiente intelectual
20 - < 30	12	Velocidad de conducción nerviosa
30 - < 40	3	Metabolismo de Vitamina D
> 40	4	Producción de Hemoglobina

Estudios del efecto del plomo en los diferentes periodos de gestación en ratas Dowley han mostrado que el plomo interfiere dramáticamente en la etapa trofoblástica, disminuye el peso placentario, retarda el crecimiento en las crías e interfiere en la nutrición y cambio de oxígeno placentario entre madres y fetos. En mujeres gestantes, expuestas a niveles elevados de plomo, se han observado problemas como hipertensión gestacional, abortos, dificultad en el parto y muerte fetal, además de que los niños pequeños son especialmente vulnerables a los efectos tóxicos del plomo y pueden sufrir alteraciones graves y permanentes para la salud, como bajo peso al nacer y alteraciones en el neurodesarrollo (Cárcamo, 2013).

Chen y colaboradores (2014) estudiaron la exposición materna a múltiples metales (incluidos Cd, Hg, Pb y Se) y la transferencia transplacentaria de estos elementos de la madre al feto en una variedad de medios sanguíneos en los EE. UU. Concluyeron que los glóbulos rojos son mejores que el plasma para reflejar la transferencia transplacentaria de Hg, Pb y Se de la madre al feto. Además, encontraron niveles significativamente más altos de Hg en plasma y glóbulos maternos y eritrocitarios en nacimientos prematuros o con bajo peso al nacer, en comparación con los nacimientos a término o normales. Este estudio piloto sentó las bases para futuras investigaciones (Chen, 2014).

Dentro del sistema endócrino, la acumulación del metal afecta el eje hipotálamo-pituitaria provocando respuestas en hormonas como la estimulante de la tiroides (TSH), la somatotropina (GH), el folículo estimulante/luteinizante (FSH/LH), la tirotrópina (TRH), la somatocrinina (GHRH), y la estimulación de gonadotropina (GnRH). De la misma manera se han encontrado niveles elevados de prolactina (PRL) en la intoxicación por plomo (Doumouchtsis, 2015).

Azcona-Cruz, en 2015 mencionó que la intoxicación con plomo es un problema de salud pública que afecta a niños y mujeres embarazadas, arriesgando la salud del feto. El plomo que se encuentra localizado en el hueso materno puede movilizarse hasta la sangre y atravesar la barrera transplacentaria provocando daños neurológicos, hematológicos y de otros órganos fetales. Cuando los niños nacen se pueden detectar efectos como bajo peso, agresividad y anencefalia. También mencionó que la concentración de plomo en el cordón umbilical representa entre el 80 y 100% del nivel de plomo en la sangre materna. Finalmente hizo mención de que en 1999 se estableció, en México, la Norma oficial Mexicana de Emergencia de Salud Ambiental, estableciendo como criterios la concentración máxima permitida de 10  $\mu\text{g}$  de plomo por dL de sangre en mujeres embarazadas y de 25 para adultos (Azcona-Cruz, et. al., 2015).

Londoño-Franco y su grupo, reportaron en 2016 que la exposición a metales pesados tiene efectos en la salud humana y en la de los animales. Ellos indican que lo anterior se encuentra asociado a esterilidad y muerte neonatal en las personas. Lo anterior debido a posibles efectos teratogénicos en el sistema nervioso del feto al interferir con su desarrollo normal trayendo como consecuencia retraso del desarrollo mental e intelectual de los niños. Por otro lado, reportan que en los animales se ha demostrado el efecto tóxico sobre los gametos y aumento de la concentración de plomo en sangre materna con consecuente disminución del tiempo de gestación y de peso en el nacimiento de las crías (Londoño-franco, et. al, 2016).

En 2017 se reportó que la Organización Mundial de la Salud considera al plomo como uno de los 10 elementos químicos de mayor preocupación para la salud pública al ocasionar 600 000 casos nuevos de discapacidad intelectual en el mundo cada año. En México se desconoce la dimensión exacta de la intoxicación humana por este metal debido a que no existen estudios representativos sobre el tema y no se cuenta con un sistema de vigilancia de los niveles de plomo en sangre (PbS). La exposición ocurre por vía respiratoria, gastrointestinal y durante el embarazo. En este último caso, el proceso inicia a

partir de la movilidad del tóxico del hueso materno, el cual ingresa al torrente sanguíneo y cruza la barrera fetoplacentaria, constituyendo una fuente de exposición endógena para el feto. EL proceso de intoxicación varía en función de la región, el país y el contexto local. La concentración de PbS se mide en microgramos ( $\mu\text{g}$ ) por decilitro (dL) de sangre. En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-199-SSA1-2000 estableció 10  $\mu\text{g}/\text{dL}$  de PbS como valor de referencia para niños menores de 15 años, mujeres embarazadas y en periodo de lactancia y de 25  $\mu\text{g}/\text{dL}$  para el resto de la población no ocupacionalmente expuesta. De acuerdo con los Centros para Control de Daño y Prevención de Estados Unidos (EUA), el valor a partir del cual se consideran niveles elevados de PbS en todos los grupos etarios de la población general es 5  $\mu\text{g}/\text{dL}$ . Las concentraciones de PbS materna menores 5  $\mu\text{g}/\text{dL}$  se han relacionado con problemas como reducción del crecimiento fetal, aumento del riesgo de abortos espontáneos y partos prematuros. En algunos niños con estas concentraciones de plomo se ha observado una disminución de hasta 6.9 puntos en su coeficiente intelectual lo cual genera un menor rendimiento académico, atención y comportamiento. También puede afectar la maduración sexual de niños y jóvenes. Los efectos de la toxicidad del Pb son mayores en poblaciones que viven en condiciones de pobreza, situación que se ha expresado como una fuente de injusticia ambiental a nivel mundial (Téllez-Rojo, et. al, 2017).

En 2018, Kumar publicó una revisión relacionada con el plomo y sus efectos sobre la reproducción. En este reporté indicó que la OMS dio a conocer los datos proporcionados por el Institute of Health Metrics and Evaluation, el cual indicó que se han producido 494 550 muertes y la pérdida de 9.3 millones de años de vida ajustados debidos a efectos a largo plazo en personas expuestas al metal. Se indicó, de la misma forma que la exposición a plomo representa el 12 % de la carga global de discapacidad intelectual idiopática del desarrollo; 2.5 % de cardiopatía isquémica y 2.4 % de accidente cerebral. En relación con el binomio plomo-embarazo, mencionó que el plomo puede movilizarse desde el hueso de las madres hasta el feto, vía circulatoria y que este hecho responde a cambios en el metabolismo mineral. Este transporte de plomo se lleva a cabo a velocidades altas y contribuye a la alta concentración de plomo en sangre durante el embarazo. El Hueso cortical y el trabecular del feto son los que poseen mayor concentración de plomo (9.8 y 14.4  $\mu\text{g}/\text{g}$  respectivamente) y ellos les origina disminución en el crecimiento (Kumar, 2018).

En el mismo año, Lamichhane y colaboradores analizaron la relación entre el plomo en la gestación y dos isoformas de GST. Ellos determinaron que existe una relación con los nacimientos, la concentración de plomo, los genes de GST de la madre y el sexo del infante. Específicamente realizaron estudios sobre aspectos relacionados con nacimientos antes de tiempo y con bebés de bajo peso se relacionó con la falta de GSTM1 (Lamichhane, et. al, 2018).

Debido a todo lo anterior se debe poner en claro que el estudio de los procesos de intoxicación por metales pesados constituye una necesidad cada vez más importante debido a que los seres vivos considerados como “superiores” carecen de mecanismos de resistencia que los ayuden a soportar las concentraciones, cada vez más crecientes, de metales como el plomo en el medioambiente. Lo anterior ha traído como consecuencia la alteración de muchos procesos fisiológicos en prácticamente todos los seres vivos, no solo los mamíferos sino la totalidad de las especies del planeta. Entre los efectos que se han detectado en el humano, cada vez se pueden nombrar más enfermedades relacionadas al contacto directo o como consecuencia de la interacción que se tiene con los metales no esenciales para el metabolismo celular. Entre ellos el proceso de la gestación y el efecto en la salud general de las madres ha sido poco estudiado.

Finalmente, otro aspecto que no ha sido explorado es el hecho de los efectos que puede tener el plomo en mujeres que se encuentran tomando terapias hormonales contra el embarazo. Ya se ha mencionado que el metal puede tener efecto en una serie de hormonas relacionadas con el ciclo gestacional, sin embargo, no hay reportes en donde se considere el proceso de una terapia hormonal a base de estrógenos y el efecto del metal.

Los antecedentes anteriores han demostrado que el problema de la intoxicación con plomo a nivel gestacional es grave en el mundo y en especial en nuestro país. Se tienen datos proporcionados en relación con observaciones llevadas a cabo en animales y mujeres embarazadas y expuestas al metal. El grave problema radica en que el plomo puede generar problemas como hipertensión gestacional, abortos involuntarios, partos prematuros, dificultad en el parto y muerte fetal. De manera adicional se sabe que cuando el parto es logrado y el bebé ha nacido, se pueden detectar alteraciones graves y permanentes para su salud, mismas que posiblemente afectarán el desarrollo del cerebro y el sistema nervioso. Lo anterior traerá como consecuencia una calidad de vida muy deteriorada para los hijos de las madres intoxicadas.

Estudios en nuestro país han demostrado que, tanto en lugares urbanos, como las ciudades de muchos de los estados de la República, así como en las zonas rurales, este problema es grave y se ha considerado como un fenómeno de interés dentro de la Salud Pública.

En nuestro país se han reportado casos de mujeres en donde se ha determinado una relación dosis-respuesta significativa entre los niveles bajos a moderados de plomo en la sangre y el riesgo de aborto espontáneo. Sin embargo, en Japón otro estudio demostró diferencias en los niveles de plomo en sangre entre los casos de aborto espontáneo y los embarazos en curso. Casos como los anteriores se han reportado en varios puntos del mundo y se ha observado que el problema del efecto del plomo en la gestación es multifactorial, lo que dificulta su estudio.

Debido a lo anterior se requieren estudios mucho más amplios para aclarar aún más los efectos de los niveles bajos y moderados de plomo en el proceso gestacional en países como el nuestro en donde muchas mujeres viven en comunidades o regiones en las cuales el uso de barro vidriado, la contaminación industrial y la poca información juegan un papel fundamental en el incremento de los daños que este metal puede ocasionar en las mujeres embarazadas o en las que están tomando terapias anticonceptivas.

Por lo tanto, dentro de este problema, existen muchas variables que implican estudios finos y estructurados en forma escalonada para tratar de ir construyendo una base sólida que ayude, en un futuro próximo, a establecer protocolos de tratamientos médicos o protocolos de acción cuando se detecte que las mujeres embarazadas pueden correr el riesgo de sufrir algún daño en su proceso gestacional.

Después de analizar la bibliografía relacionada con estrés problema se pudo afirmar que dentro de este existen varios temas relacionados entre sí. A continuación, se citan algunos puntos que, a consideración del equipo de trabajo dentro del cual se realizó esta investigación, se deberían explorar para obtener la información requerida para un análisis integral de este fenómeno.

1. Determinar la dosis respuesta entre la cantidad de plomo en sangre en mujeres embarazadas y expuestas a plomo.
2. Realizar estudios con el objetivo de conocer los procesos de recambio de calcio y plomo en hueso, en mujeres embarazadas.

3. Investigar la influencia de los factores geográficos, la raza, la edad y las condiciones de culturales que influyen en este fenómeno.
4. Relacionar las condiciones de salud y su influencia en las mujeres gestantes intoxicadas con plomo.
5. Estudiar los posibles factores genéticos implicados en este fenómeno de intoxicación con plomo.
6. Evaluar la influencia del plomo sobre la actividad y concentración de hormonas relacionadas con el proceso de gestación y usadas como anticonceptivos.
7. Implementar, mediante la investigación, posibles tratamientos con agentes quelantes, antioxidantes o micronutrientes para tratar de disminuir los daños ocasionados por el metal durante el embarazo.
8. Estudiar la relación entre la generación de estrés oxidativo por la presencia de plomo y su efecto en el proceso gestacional.
9. Estudiar el metabolismo celular y los procesos de transporte de sustancias en la madre y el feto en presencia de plomo.
10. Incrementar los modelos de estudio con animales de laboratorio, por ser ellos sujetos en los cuales las condiciones mencionadas anteriormente pueden ser bien controladas.

En este trabajo iniciamos el estudio del efecto de la intoxicación con plomo y la generación de especies reactivas de oxígeno en modelos marinos usando ratas hembra de la cepa Wistar, a las cuales se les administró plomo desde antes del embarazo por vía oral hasta después de un mes de amamantar a las crías. Las variables del estudio fueron la exposición al metal, la exposición al metal en presencia de la hormona y animales solo tratados con hormonas. De esta forma esperamos observar el efecto de la exposición a plomo en condiciones normales (representando un embarazo llevado a cabo en una zona contaminada con el metal) y en presencia de un tratamiento anticonceptivo normal (representando una población de mujeres que de forma habitual toma anticonceptivos) y, finalmente, un grupo de estudio basado en la administración del metal en presencia de plomo (simulando una población que está usando anticonceptivos y que se encuentra expuesta a plomo de forma habitual).

Los resultados nos indicarán lo que está sucediendo en este modelo de estudio y también cuales son los pasos a seguir para poder continuar en la investigación.

#### 4 JUSTIFICACIÓN

El proceso de embarazo compromete dos vidas, la de la madre y la del feto. Debido a las características químicas del plomo y su capacidad de unión a un gran número de macromoléculas, es evidente que el problema de la contaminación por este metal en madres embarazadas debe ser una de las prioridades en un país como México que, como ya se ha descrito, presenta graves problemas de contaminación por metales pesados en muchos de sus estados y en comunidades rurales que usan este elemento en varios procesos de su vida cotidiana.

Dentro de los mecanismos por medio de los cuales el plomo ocasiona daños se encuentra la generación de especies reactivas de oxígeno, las cuales producen un gran número de daños intracelulares que pueden terminar en la activación de una serie de enfermedades degenerativas.

Por otro lado, dentro de los procedimientos de identificación de enfermedades se han propuesto ciertas moléculas como bioindicadores de daño, de susceptibilidad y de exposición. Estos marcadores se utilizan para poder determinar, en cierto tiempo en efecto de agentes tóxicos en los seres vivos. En este grupo de investigación se ha estudiado la actividad de una enzima como indicador de daño. Se ha determinado mediante procedimientos experimentales y de quimiometría la relación existente entre la intoxicación con plomo y la generación de especies reactivas de oxígeno en riñones de ratas macho Wistar. Por esta razón se procedió a estudiar la actividad de esta proteína en los diversos órganos de los diferentes grupos experimentales.

Todo lo anterior se relaciona para dar lugar al estudio de los posibles daños oxidativos ocasionados durante la intoxicación con plomo en ratas gestantes expuestas o no a plomo y tratadas o no con anticonceptivos orales. Los resultados generarán datos que servirán, por un lado, para comprender el efecto del metal bajo las condiciones mencionadas, por otro, para realizar un análisis de los mismos y establecer nuevos estudios con la finalidad de conocer más sobre el efecto de la intoxicación con plomo en la gestación.

## **5 HIPÓTESIS**

La intoxicación con plomo puede generar efectos nocivos, ocasionados por la generación de especies reactivas de oxígeno, en el proceso anormal de gestación de las ratas sí como en animales tratados con terapias anticonceptivas, de tal suerte que los efectos podrán manifestarse como alteraciones sistémicas de las madres, así como en las crías de las mismas.

## **6 OBJETIVOS**

### **6.1 GENERAL.**

Estudiar el efecto de la exposición a plomo en el proceso gestacional y en el uso de terapias anticonceptivas en ratas de la cepa Wistar para determinar si existen alteraciones sistémicas, relacionadas con la generación de especies reactivas de oxígeno, sobre el tiempo de gestación, el número de crías y posibles efectos sistémicos del tóxico en las madres.

#### **6.1.1 ESPECÍFICOS.**

1. Analizar el efecto de la exposición a plomo en el tiempo de gestación y el número de crías en ratas expuestas a plomo en ausencia y presencia de hormonas esteroidales anticonceptivas.
2. Estudiar la generación de especies reactivas de oxígeno en cerebro, hígado y riñón, así como en ovarios, timo y bazo de las ratas expuestas o no a plomo en el proceso gestacional, en ausencia y presencia de hormonas esteroidales anticonceptivas.
3. Evaluar la actividad de la enzima Glutatión S-transferasa en cerebro, hígado y riñón, así como en ovarios, timo y bazo de las ratas expuestas a plomo en ausencia y presencia de hormonas esteroidales anticonceptivas.
4. Estudiar el efecto sistémico de la exposición a plomo en ratas expuestas a plomo en ausencia y presencia de hormonas esteroidales anticonceptivas.

## **7 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

### **7.1 GRUPOS EXPERIMENTALES.**

Se establecieron grupos de seis ratas hembra de la cepa Wistar con peso promedio de 150 gramos el cual correlaciona con el periodo de madurez de sus órganos reproductores (García,2016). Los animales fueron colocados en cajas de acrílico en parejas para iniciar el proceso de gestación. Se alimentaron con una dieta balanceada y se sometieron a ciclos de 12 horas de luz-oscuridad. Los grupos establecidos fueron los siguientes.

Para iniciar el proceso de gestación se colocaron, en cajas por separado, una rata hembra y una rata macho a las cuales se les dará plomo por vía oral a una concentración de 1000ppm durante el tiempo que dure la fase de reproducción, gestación, la fase de parto y un mes de lactancia.

Grupo control. Los animales fueron mantenidos con agua de beber y comida normal durante todo el periodo experimental.

Grupo expuesto a plomo. Los animales fueron tratados con una solución de 1000 ppm de acetato de plomo por vía oral durante todo el periodo de tiempo experimental, el cual comprendió la gestación, el parto y un mes de lactación.

Grupo expuesto a levonogestrel y etinil estradiol (anticonceptivos orales). Los animales fueron tratados con tratamiento anticonceptivo hormonal por vía intraperitoneal usando una concentración adecuada al peso de las ratas durante 21 días.

Grupo expuesto a levonogestrel y etinil estradiol (anticonceptivos orales) más plomo. Los animales se trataron con las hormonas por vía intraperitoneal usando una concentración adecuada al peso de las ratas durante 21 días a la vez que se les administró plomo por vía oral a una concentración de 1000 ppm.

Antes de iniciar los diferentes esquemas de trabajo se procedió a pesar la rata hembra. Después del parto se volvió a pesar a la madre y después a las crías de todos los grupos.

Las madres fueron colocadas en cajas metabólicas para coleccionar muestras de orina de 12 horas. Posteriormente las madres fueron sacrificadas y se tomaron muestras de sangre, riñón, hígado, cerebro, timo, ovarios y páncreas, con ellos se llevaron a cabo los análisis que se detallan a

continuación. Todos los órganos fueron pesados y observados microscópicamente. Posteriormente fueron homogenizados para realizar las siguientes determinaciones.

## **7.2 ENSAYOS BIOQUÍMICOS.**

### **7.2.1 Examen general de orina.**

Las determinaciones realizadas mediante esta metodología proporcionarán datos relacionados con el estado metabólico de órganos como el hígado y el riñón, así como de procesos relacionados con el metabolismo oxidativo y el estado general del riñón.

La base de esta técnica es la reacción de la muestra con los reactivos desecados unidos a una fase sólida que se encuentra adherida a un soporte plástico. Se proveen reactivos para la detección de urobilinógeno, glucosa, cetonas, bilirrubina, proteínas, nitrito, pH, sangre, densidad, leucocitos y gravedad específica.

Los principios químicos de cada prueba son los siguientes.

**Leucocitos.** Esta prueba reveló la presencia de esterasas granulocitarias. Las esterasas escinden un derivado del éster pirazol aminoácido para liberar un derivado de hidroxipirazol que luego con la sal de diazonio revelará un producto violeta.

**Urobilinógeno.** La prueba está basada en la reacción de unión de una sal de diazonio con el urobilinógeno urinario en un medio ácido. El color vira del rosa pálido al rosa intenso.

**Glucosa.** Reacción enzimática secuencial donde la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa dando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Luego, la peroxidasa cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno con ioduro de potasio, formándose productos coloreados que van desde celeste verdoso, pasando por marrón verdoso intermedio, a marrón.

**Cetonas.** Se basa en la reacción de ácido acetoacético de la orina con nitroprusiato. El color resultante va desde tostado, cuando no hay reacción, a distintos tonos de púrpura para reacciones positivas.

**Bilirrubina.** Se fundamenta en la unión de la bilirrubina con la sal de diazonio del 2,4diclorofenilo en un medio fuertemente ácido. El color cambia de tostado suave a tostado intenso.

**Proteínas.** Basada en el cambio de color del indicador, azul de tetrabromofenol, en presencia de proteínas. Una reacción positiva está indicada por un cambio de color del amarillo verdoso al verde, y luego al verde intenso.

**Nitrito.** En esta prueba se lleva a cabo la reacción de ácido p-arsanílico y nitrito, derivado del nitrato de la dieta en presencia de bacterias de la orina, para formar un compuesto de diazonio. Este compuesto reacciona con N-(1-naftil) etilendiamina en un medio ácido. El color resultante es rosa. Cualquier tonalidad rosada es considerada positiva.

**pH.** Se utilizan indicadores dobles (rojo de metilo y azul de bromotimol) los cuales dan un amplio espectro de colores cubriendo el rango de pH urinario completo. Los colores varían desde ocre, pasando por verdoso-amarillento, a verde azulado.

**Sangre.** Esta prueba detecta la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina, la cual cataliza la reacción de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina con hidroperóxido orgánico tamponado. El color resultante varía desde verdoso-amarillento, pasando por verde azulado, hasta azul oscuro.

**Densidad.** Se fundamenta en el cambio de pKa, en presencia de los cationes urinarios, se liberan protones de un polielectrolito produciéndose un cambio de color en el indicador azul de bromotimol desde azul a amarillo (Free, A.H. y Free, H.M, 1972).

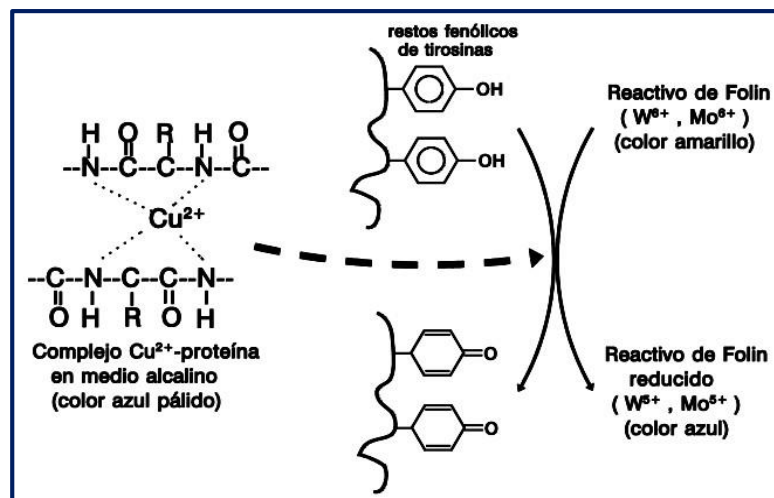
Procedimiento. La muestra de orina se recolectó en un pequeño recipiente y a una muestra se le colocó en una tira reactiva de uroanálisis (10 LG parameter Urine Reagent Strip 100 Strips URI-10P) la cual indicó, por medio de una reacción de color, la concentración de glucosa, bilirrubina, cetonas, proteínas y nitritos, así como la gravedad específica, la presencia o ausencia de sangre, el valor de pH y la existencia o no de leucocitos en orina.

### **7.3 MEDICIÓN DE PROTEÍNAS EN SUERO, ORINA Y HOMOGENEIZADO DE RIÑÓN, CEREBRO E HÍGADO POR MÉTODO DE LOWRY MODIFICADO (NAVARRO-MORENO, 1999).**

El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con los grupos amino de las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de LambertBeer ( $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ ). Este método consta de dos etapas (la interacción de los reactivos y las proteínas se señalan en la figura 5). En la primera, los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con

tartrato. En la segunda etapa se produce la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (Lowry et al., 1951).

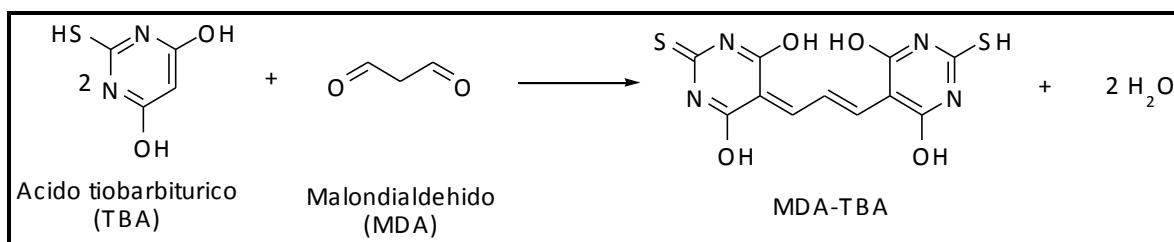
Procedimiento. Se colocaron en un tubo de ensaye 790  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 10  $\mu\text{L}$  de la muestra, 100  $\mu\text{L}$  de desoxicolato de sodio ( $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}$ ), 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ , usando una dilución 1:3) y 2  $\mu\text{L}$  de una solución compuesta por sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) al 0.5%, 2 g de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) y 0.134 g de tartrato de sodio potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ). Las muestras se agitaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después se procedió a leer a una longitud de onda de 750 nm en el equipo de UV/Visible Pekín Elmer Lamda 25. La curva patrón se realizó con albúmina sérica bovina (BSA). Esta se detalla en el Anexo 3 de esta Tesis. La figura 7 muestra la reacción llevada a cabo con esta técnica.



**Figura 7.** Reacción entre la proteína y los reactivos (Tomado de [www3.uah.es](http://www3.uah.es)).

## 5.1 CUANTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN MUESTRAS DE HOMOGENEIZADO DE RIÑÓN, HÍGADO, CEREBRO, TIMO, BAZO Y OVARIOS.

El método espectrofotométrico del ácido tiobarbitúrico (TBA) es el más comúnmente utilizado para la cuantificación de malondialdehído (MDA). La determinación de los niveles de MDA en materiales biológicos es un método conveniente, sensible y ampliamente utilizado para estimar cuantitativamente la extensión de la peroxidación lipídica. En la figura 8 se muestra la reacción que ocurre por ataque del MDA sobre el grupo metileno activo del TBA. Un mol de MDA reacciona con dos moles de TBA en medio ácido y a alta temperatura. La velocidad de esta reacción depende de la concentración de TBA, la temperatura y el pH. El pigmento generado posee un pico máximo de absorbancia a 532-535 nm y otro secundario a 245-305 nm (sedici.unlp.edu.ar).



**Figura 8.** Esquema de la reacción entre malondialdehído y ácido tiobarbitúrico (Feliciano,2019).

Procedimiento. Se utilizaron 0.2 mL del homogenado de corteza renal, de hígado y de cerebros realizados cada uno por separado en una solución buffer fosfato salino (PBS) 0.1M a pH 7.4, el volumen se completa a 1 mL con la misma solución. Para llevar a cabo la reacción se adicionaron 0.025 mL de butirilhidroxitolueno (BHT) y 300  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) al 30% en un tubo de ensayo. Posteriormente éste se agitó vigorosamente y se colocó en hielo durante 2 horas. Transcurrido el tiempo se centrifugó en una microcentrifuga (Eppendorf Centrifuge 5424) a 2000 rpm por un tiempo de 15 minutos. Al terminar el tiempo se separó el sobrenadante y se adicionó en un tubo de ensayo, al cual se le agregó 1  $\mu$ L del sobrenadante, 0.075  $\mu$ L de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0.1M y 0.25  $\mu$ L de una solución al 1% de ácido tiobarbitúrico (TBA), se agitó y colocó a ebullición en un baño

maría por un tiempo de 15 minutos. Terminado el tiempo, se dejó enfriar y se midió la absorbancia a longitudes de onda de 532 y 600 nm en el espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 25.

La actividad de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico se determinó por la ecuación de LambertBeer:

$$A = \epsilon cl$$

Dónde:

A es la diferencia de absorbancia en un intervalo de longitud de onda (532-600 nm).

$\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar ( $1.56 \times 10^4 \text{ mmol}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ ).

c es la concentración de las especies reactivas de TBA.

l es la longitud de la celda.

#### **7.4 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST) EN MUESTRAS DE HOMOGENEIZADO DE RIÑÓN, HÍGADO, CEREBRO, SUERO, ORINA, TIMO, BAZO Y OVARIOS.**

La función principal de las GST es desintoxicar los xenobióticos catalizando el ataque nucleofílico por GSH sobre átomos electrofílicos de carbono, azufre o nitrógeno de dichos sustratos xenobióticos no polares, evitando así su interacción con proteínas celulares cruciales y ácidos nucleicos. La función de las GST en este rol es doble: unir el sustrato en el sitio H hidrofóbico de la enzima y el GSH en el sitio G hidrófilo adyacente, que juntos forman el sitio activo de la enzima y posteriormente activar el grupo tiol de GSH, permitiendo el ataque nucleofílico sobre el sustrato. Los compuestos dirigidos de esta manera por las GST abarcan una amplia gama de toxinas ambientales o de otro modo exógenas, que incluyen agentes quimioterapéuticos y otras drogas, pesticidas, herbicidas, carcinógenos y epóxidos derivados de forma variable. Las reacciones de desintoxicación comprenden los primeros cuatro pasos de síntesis de ácido mercaptúrico, con la conjugación a GSH que sirve para hacer los sustratos más solubles y permitir que sean eliminados de la célula por transportadores como la proteína 1 asociada a resistencia a múltiples fármacos (MRP1) (Oakley, 2011). Después de la exportación, los productos de conjugación se convierten en ácidos mercaptúricos y se excretan a través de la orina o la bilis. La mayoría de las isoenzimas de mamíferos tienen afinidad por el sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzono, y

los ensayos espectrofotométricos que utilizan este sustrato se usan comúnmente para informar la actividad de GST (Habig et al, 1974).

Se utilizó un homogeneizado de riñón, de hígado y de cerebro realizado cada uno y por separado en un amortiguador de fosfato 0.1 M y pH 7.4. Se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos y se recolectó el sobrenadante, al cual se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry, de la misma manera que a las muestras de orina y sangre. Se procedió a realizar los ensayos en una celda de vidrio, se le agregó el volumen correspondiente de un amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 6.5, el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno a una concentración final de 1 mM y el ligante glutatión reducido a una concentración final de 1 mM. Esta mezcla se homogenizó por inversión y finalmente se adicionó el volumen correspondiente a 1 mg/mL de proteína total. Se midió el aumento de absorbancia a 350 nm por un tiempo de cinco minutos con intervalos de 20 segundos en un espectrofotómetro UV/Vis-Perkin Elmer Lambda 25.

La actividad de la GST se determinará por la ecuación de Lambert-Beer de la siguiente manera:

$$A = \epsilon cl$$

Dónde:

A es la absorbancia.

$\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon = 9.6 \text{ mg}^{-1}\text{mL}^{-1}\text{min}^{-1}$ ).

c es la concentración de la enzima GST.

l es la longitud de la celda.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias generales entre los grupos de tratamiento se compararon mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. Minitab, Versión 2016, se utilizó para todos los análisis estadísticos.

## 8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 PESO CORPORAL DE LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN.

En la tabla 1 se muestran los resultados de los pesos inicial y final de los grupos de estudio, así como la diferencia de los mismos. Al realizar el análisis estadístico, se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control, con valor de  $p < 0.05$  en los grupos marcados con las letras a y b.

Los grupos control, expuesto a plomo y el grupo tratado con hormonas no presentaron diferencias significativas en relación con el peso al inicio y al final del tratamiento. El grupo expuesto a tratamiento hormonal y a plomo presentó una ganancia significativa de peso de 71 gramos.

Durante el proceso de tratamiento experimental se observó que tanto en las ratas expuestas a plomo como las tratadas con hormona, disminuyeron su ingesta de comida diaria, así como el agua de bebida la cual contenía la solución del metal. El grupo hormona+ plomo también disminuyó su ingesta de comida y de la solución de plomo, sin embargo, aumentó de peso lo cual indica que la ganancia en peso, mayor al control, no se debe a la ingesta de nutrientes, sino a la sinergia entre el plomo y la hormona, provocando, posiblemente hinchamiento o generación de tejido graso en las ratas. Cuando las ratas fueron sacrificadas, se pudo observar que éstas contenían una gran cantidad de grasa abdominal.

**Tabla 2.** Peso corporal de los roedores al inicio y al final del tiempo de experimentación (n=6).

Grupo	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Ganancia de Pesos (g)
Control	150.17 ± 3.6	172.00 ± 25.78	21.83
Plomo	154.89 ± 9.39	156.21 ± 14.75	1.40
Hormona	156.52 ± 5.75	193.57 ± 24.74	37.0
Hormona más plomo	146.66 ± 7.0 <sup>a</sup>	217.91 ± 15.44 <sup>b</sup>	71.25

Se ha reportado en la literatura que el uso de anticonceptivos orales puede causar el aumento de peso por la generación de tejido graso, lo cual puede comprometer la salud de las mujeres predisponiéndolas a sufrir enfermedad cardiovascular y diabetes ([http://red.unal.edu.co/cursos/medicina/anticoncepcion/u2/pdf/anexo\\_2.pdf](http://red.unal.edu.co/cursos/medicina/anticoncepcion/u2/pdf/anexo_2.pdf)). En los grupos de experimentación de este trabajo se usó como compuesto anticonceptivo el producto comercial constituido por levonogestrel y etinil estradiol, éste compuesto por sí sólo no ocasionó un aumento significativo de peso. Un resultado similar se observó en el grupo intoxicado con plomo. Sin embargo, al combinarse el tratamiento hormonal con el plomo el aumento se pudo observar en el 100% de la población. Se ha reportado los estrógenos y los gestágenos a grandes dosis pueden inhibir por sí solos la ovulación y utilizados en conjunto, su efecto sinérgico permite disminuir la dosis de cada uno. La inhibición sobre el eje hipotálamo-hipófisis es dosis dependiente, a menores dosis, los niveles basales de gonadotrofinas son mayores. En los anticonceptivos que poseen etinilestradiol (EE2) y levonorgestrel (LNG) como progestágeno se ha conservado una relación entre ambos de 1:5 que parece ser necesaria para mantener un adecuado balance en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. (Busquets, et. al, 2002).

En relación con el aumento de peso y la disminución de la ingesta de alimentos, se ha reportado que todos los tipos de anticonceptivos hormonales previenen el embarazo mediante dos mecanismos principales. La inhibición total o parcial de la ovulación es uno de los mecanismos de acción. Las hormonas que contienen estos anticonceptivos actúan en el cerebro. Hacen que el hipotálamo y la glándula pituitaria reduzcan la producción de las hormonas necesarias para el desarrollo folicular y la ovulación. El espesamiento del moco cervical, causado por la progestina, es otro mecanismo de acción de los anticonceptivos hormonales. El moco más espeso actúa como una barrera contra los espermatozoides, dificultándoles la entrada a la cavidad uterina. Si la mujer ovulara, esta barrera de moco reduce considerablemente las probabilidades de que el óvulo sea fecundado. Todos los anticonceptivos hormonales también tienen efectos en el endometrio y lo hacen más delgado. Entre los efectos secundarios más comunes están los siguientes: náuseas, mareos, sensibilidad mamaria anormal, dolores de cabeza, cambios de estado de ánimo y aumento de peso (Secretaría de Salud, 2002, Cardo-Prats y Baixauli-Fernández, 2004). De la misma forma los trabajos realizados por el grupo

de investigación de la UNPA han observado aumento de peso cuando los animales son intoxicados con plomo en esquemas de intoxicación aguda y crónica

## **8.2 PESO DE ÓRGANOS DE LOS GRUPO DE ESTUDIO.**

En la tabla 2 se muestran los resultados de las diferencias de los pesos obtenidos en los órganos de estudio. Los análisis estadísticos mostraron que solo existió una diferencia significativa con un valor de  $p < 0.05$  en el hígado de los grupos control y expuesto a plomo. Se ha reportado que uno de los efectos de la intoxicación con plomo es alterar el metabolismo de micronutrientes esenciales como el calcio. Esto se puede reflejar en el desarrollo anormal de órganos y tejidos (Ramírez, 2005). Sin embargo, solo se observó una disminución de peso en el hígado del grupo expuesto a plomo en relación con el grupo control. En el grupo de investigación se ha observado que cuando las ratas Wistar macho son expuestas al mismo tóxico, el efecto en el peso corporal y el de sus órganos varía en función de la dosis y la vía de administración (Hernández, 2013., Méndez, 2016., Feliciano, 2019). En las ratas hembra de este estudio no se observó un efecto severo del metal en el peso de los ovarios, lo cual concuerda con las observaciones experimentales realizadas por Foster en 1992, quién observó que aun cuando el tiempo de intoxicación con plomo fue muy largo, no se observaron efectos sobre el estado general de los animales, incluidos sus procesos reproductivos, el ciclo menstrual y la menopausia. No obstante, son diferentes con los de Lauglin quien en 1987 si reportó diferencias en los ciclos menstruales en otra especie de monos (Lauglin, et. el, 1987., Foster, 1992). Lo anterior demuestra que los efectos del plomo dependen de la especie, el tiempo y la dosis del tóxico. Sin embargo, el plomo disminuyó el peso del hígado, alterando, posiblemente algunas de las funciones de este órgano en las ratas hembra.

**Tabla 3.** Peso de los órganos de los roedores al inicio y al final del tiempo de experimentación (n=6).

GRUPOS	Ovarios (g)	Timo (g)	Bazo (g)	Cerebro (g)	Hígado (g)	Riñón (g)
<b>CONTROL</b>	1.14 ± 0.38	0.22 ± 0.12	0.53 ± 0.13	1.69 ± 0.11	8.45 ± 1.73	1.59 ± 0.25
<b>PLOMO</b>	0.73 ± 0.25	0.38 ± 0.58	0.64 ± 0.46	1.57 ± 0.16	6.11 ± 1.62	1.71 ± 0.21
<b>HORMONA</b>	1.57 ± 0.75	0.39 ± 0.11	0.66 ± 0.06	1.70 ± 0.28	7.64 ± 1.23	2.09 ± 0.36
<b>HORMONA+PLOMO</b>	1.28 ± 0.68	0.35 ± 0.07	0.75 ± 0.24	1.69 ± 0.15	6.88 ± 1.83	1.68 ± 0.40

### 8.3 RELACIÓN PESO CORPORAL-PESO DEL ÓRGANO.

Para analizar de forma más detallada el efecto de los diferentes tratamientos en los órganos de los grupos experimentales, se realizó esta relación y en cada caso se pudo observar que aun cuando estadísticamente la tabla 2 muestra datos que al parecer carecen de significancia numérica, el análisis de esta relación puede mostrar lo que le está sucediendo a cada glándula y órgano analizado en este trabajo. Esta relación proporciona una idea relacionada con el desarrollo de los órganos en relación peso corporal de los animales. La edad y el sexo, así como la constitución genética, factores nutricionales, exposición al ambiente y manejo sanitario, producen cambios en el estado fisiológico de los animales de laboratorio, que conducen a un incremento o pérdida de peso de ciertas estructuras anatómicas. Por estas razones, el desarrollo de animales de laboratorio como ratones y ratas ha sido estudiado en detalle desde hace muchos años, y la mayoría de estos trabajos están dirigidos hacia el peso de los órganos, resaltándose cada día más las diferencias, no sólo en cuanto a la edad y al sexo de los animales, sino también en relación con otras variables (Fuentes y Candela, 2003). Las variables usadas en este estudio fueron las dos hormonas esteroidales y el plomo. La tabla 3 muestra el cálculo para los diferentes órganos y tejidos analizados.

**Tabla 4.** Relación peso corporal y peso de los órganos en los animales de estudio (n=6).

<b>GRUPOS</b>	<b>Relación Ovarios</b>	<b>Relación Timo</b>	<b>Relación Bazo</b>	<b>Relación Cerebro</b>	<b>Relación Hígado</b>	<b>Relación Riñón</b>
<b>CONTROL</b>	150	782	324	102	20	108
<b>PLOMO</b>	214	411	244	100	26	91
<b>HORMONA</b>	123	509	302	123	25	93
<b>HORMONA + PLOMO</b>	218	621	291	129	32	130

En relación con los ovarios se observó que en el caso de las ratas expuestas a plomo y a hormona + plomo la relación aumento, lo cual indica que en estos casos los ovarios mostraron una disminución de su crecimiento, mientras que en el caso del grupo tratado con las hormonas los ovarios aumentaron de peso o de volumen. En el caso del bazo y del timo se observó que en relación con el control los animales expuestos a los tres esquemas de intoxicación mostraron una disminución de la relación, siendo mayor en el caso de la intoxicación con plomo, ello indica que los tres aumentaron su peso o su volumen. En el caso del timo, se ha reportado que, por lo general es una glándula cuyo desarrollo depende de la edad y que al paso del tiempo se va deteriorando en humanos (Fuentes y Candela, 2003). En el caso del cerebro se observó un aumento de la relación en el caso de los grupos expuestos a hormona y hormona + plomo. Para el hígado se determinaron los valores que indicaron un aumento mayor de la relación en el grupo hormona + plomo, lo que indica que, en este caso, posiblemente, el hígado se vio más afectado en su desarrollo normal. Finalmente, el riñón al ser expuesto a plomo y a hormona presentaron una disminución de la relación al comparar los resultados con el grupo control. Lo cual indicó que, bajo estas condiciones, este órgano pudo haber aumentado su peso. Sin embargo, cuando se expuso a los animales a hormona + plomo la relación aumento, denotando una disminución en el desarrollo normal de los riñones. Se ha reportado que el aumento del peso de los órganos puede

ser signo de enfermedades o anormalidades patológicas. La edad es un factor que influye en el del peso de algunos órganos, así como el peso corporal. Otros han señalado que este último factor no incidiría en el peso de estos órganos (Olave, et. al, 2014). En el caso, y como se puede ver en la tabla 3, los órganos que presentaron aumento de peso fueron timo bazo y riñón en el caso de la exposición a plomo; ovario, timo, bazo y riñón para el caso de los grupos tratados con hormonas, así como timo y bazo para el grupo hormona + plomo.

#### 8.4 MEDICIÓN DE LA LONGITUD DE TIMO, OVARIOS Y BAZO.

Para continuar explorando los efectos de los diferentes esquemas de intoxicación se procedió a medir la longitud de las glándulas timo y ovarios y del órgano bazo, los cuales se encuentran relacionados entre sí con el proceso gestacional.

Debido a todo lo anterior se procedió a realizar las mediciones. La tabla 4 muestra los resultados. Solo se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la longitud en los ovarios de los tres grupos experimentales tratados con plomo, hormona y hormona + plomo los cuales mostraron una disminución.

EL grupo que más disminuyó fue el tratado con las hormonas. El timo y el bazo no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Las diferencias encontradas entre el peso, la relación entre el peso del órgano y la longitud de los diferentes órganos y glándulas podrían originar diferencias en el proceso de gestación o el uso de hormonas esteroideas.

**Tabla 5.** Longitud de los ovarios, el timo y el bazo de los animales de estudio (n=6).

GRUPO	Ovarios (cm)	Timo (cm)	Bazo (cm)
CONTROL	12.83 ± 1.43 <sup>a</sup>	2.10 ± 0.91	9.05 ± 2.10
PLOMO	10.80 ± 2.58 <sup>b</sup>	2.16 ± 1.41	8.40 ± 1.31
HORMONA	8.88 ± 0.73 <sup>b</sup>	2.37 ± 0.55	9.08 ± 0.75
HORMONA + PLOMO	9.33 ± 1.42 <sup>b</sup>	2.11 ± 1.42	9.93 ± 1.32

El timo es una glándula que se localiza en el tórax y tiene como funciones el desarrollo de la inmunidad mediada por células; el desarrollo de los linfocitos y el control de la función inmunológica de otros órganos linfoides (ganglios, bazo y nódulos). Además, sintetiza la hormona timulina, la timopoyetina, el factor humoral tímico, la timosina y otras sustancias necesarias para la formación de los linfocitos; actúa como antagonista de la función gonadal durante el desarrollo embrionario y juega un importante papel en la inmunidad del recién nacido (Piña, et. al, 2004). El bazo es el responsable de la hematopoyesis fetal. Es el órgano que se interpone entre la circulación sistémica y el sistema venoso portal y es el único tejido linfático especializado. Sus funciones son: 1) Filtración de la sangre eliminando los glóbulos viejos del sistema circulatorio (función homeostática), transformando la hemoglobina en bilirrubina y liberando el hierro a la circulación para su nueva utilización. 2) Tiene funciones inmunológicas y no inmunológicas ya que el inicio de la respuesta inmunológica y la elaboración de los antígenos ocurre en la zona marginal del bazo. Produce IgM contra los antígenos bacterianos y es responsable de la fagocitosis. 3) Función hematológica almacenando eritrocitos, plaquetas y glóbulos blancos y 4) Función hemostática produciendo los factores 8 y de Von Willebrand que participan en la coagulación (Mota-Ramírez, 2016). El bazo no tiene el metabolismo del hígado, así como tampoco las funciones cruciales del páncreas y los riñones, por lo que el interés en él ha sido limitado y prácticamente desestimado por clínicos (Larrañaga, et. al, 2014). Por su parte, el ovario es una glándula doble dado que produce secreciones tanto exocrinas (liberan células sexuales al exterior) como endocrinas (producen hormonas que vierten a la sangre). En su interior se encuentran, en distintas etapas de desarrollo, los folículos ováricos, estructuras globulares que alojan un ovocito. A diferencia de otras glándulas del cuerpo, la actividad del ovario es cíclica. En la mujer el ciclo ovárico se denomina ciclo menstrual y en él pueden identificarse varias etapas: folicular, ovulatoria, luteal  $\pm$  menstrual. Los acontecimientos que tienen lugar durante cada una de ellas son peculiares y diferentes a las de las otras etapas (Castillo, 2011).

#### **8.5 NÚMERO Y PESO DE CRIAS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.**

La tabla 6 muestra el número de crías y el peso de las mismas para cada grupo experimental. Los animales control tuvieron de 9 a 14 crías con un peso promedio de 5.86 gramos. Los animales expuestos a plomo tuvieron de 6 a 11 crías con un peso comparable al de las crías del grupo control. Cuando las hembras fueron tratadas con las hormonas anticonceptivas, el número de crías disminuyó de 5 a 9 sin alteración en el peso. Sin embargo, cuando las ratas fueron intoxicadas con plomo y al

mismo tiempo tratadas con las hormonas, el número de crías fue de 0 a 5. Al comparar los pesos de los animales se observó que cuando fueron tratados con plomo o con hormona hubo una disminución y una ganancia de peso estadísticamente significativa de 0.46 y 0.39 gramos respectivamente ( $p < 0.01$ ).

**Tabla 6.** Número de crías y peso de las mismas en los grupos de estudio (n=6).

	<b>NÚMERO DE CRÍAS</b>	<b>PESO DE LAS CRÍAS (g)</b>
<b>CONTROL</b>	9 a 14 (n=6)	5.86 ± 0.20 <sup>a</sup>
<b>PLOMO</b>	6 a 11 (n=5)	5.20 ± 0.25 <sup>a</sup>
<b>HORMONA</b>	5 a 9 (n=4)	6.25 ± 0.66 <sup>b</sup>
<b>HORMONA + PLOMO</b>	0 a 5 (n=3)	5.00 ± 0.66

Se sabe que la susceptibilidad individual juega un papel importante dentro de los procesos toxicológicos, por lo cual dentro de una misma población pueden existir miembros en donde los efectos sean totalmente diferentes (Cruz, 2019).

Debido a lo anterior en la tabla 7 se muestra a detalle el número de crías y el peso de cada una de en todos los miembros de los diferentes grupos. El 100% de las integrantes del grupo control tuvieron crías y se mantuvieron vivas después del parto; en el caso del grupo expuesto a plomo una de las ratas murió durante el periodo de gestación; cuando las ratas fueron tratadas con hormona dos no se embarazaron y, finalmente la combinación de la intoxicación con plomo y el tratamiento con hormonas anticonceptivas el 50% no se embarazaron. Otra diferencia entre los animales fue que los grupos control y expuesto a plomo tuvieron un periodo de gestación de 23 días mientras que el tratado con hormona y el tratado con hormona + plomo presentaron un periodo de gestación de 28 días.

**Tabla 7.** Número de crías y peso de las mismas en los grupos de estudio (n=6).

CONTROL			PLOMO			HORMONA			HORMONA +PLOMO		
RATA	CRIAS	PESO(g)	RATA	CRIAS	PESO(g)	RATA	CRIAS	PESO(g)	RATA	CRIAS	PESO(g)
RATA1	14	6	RATA1	9	5	RATA1	6	7	RATA1	8	6
RATA2	11	6	RATA2	8	6	RATA2	9	6	RATA2	NE	
RATA3	11	6	RATA3	6	5	RATA3	5	7	RATA3	2	4
RATA4	9	6	RATA4	14	5	RATA4	NE		RATA4	NE	
RATA5	12	5	RATA5	11	5	RATA5	5	5	RATA5	5	5
RATA6	11	6	RATA6	M	M	RATA6	NE		RATA6	NE	

El plomo es capaz de alterar el metabolismo de las hormonas sexuales y otras como la tiroides, pituitaria y hormonas suprarrenales. El plomo traspasa fácilmente las paredes de la placenta y su concentración en la sangre del recién nacido es similar o mayor que la de la madre. La OMS ha indicado que, uno de los principales efectos del metal es el bajo peso al nacer. Una concentración de plomo mayor de 10 µg/g en el cordón umbilical se correlaciona con una deficiencia en el desarrollo temprano y malformaciones congénitas. Así también puede ocurrir muerte fetal y/o aborto. El plomo que se encuentra circulando en la sangre materna, aún después del parto, se puede difundir hacia las glándulas mamarias y estar presente en la leche materna, aumentando así una exposición que ya se había iniciado desde el embarazo. Un estudio en ratas Wistar preñadas expuestas a concentraciones de 0.06, 0.16, 0.26 µg de plomo por vía Inhalatoria y vía digestiva mostró que el número de crías fue menor a medida que se incrementó la concentración de plomo, de tal forma que las ratas expuestas a 0.26 µg de plomo tuvieron en promedio 5 crías mientras que las ratas que no recibieron plomo tuvieron en promedio 10 (Díaz, et. al, 2017). En este caso, la exposición a plomo ocasionó la muerte de una de las ratas y las crías disminuyeron de peso, en relación con el control. Cuando se trataron con hormona el número de ratas preñadas disminuyó y al combinar este tratamiento con el plomo la disminución de los embarazos fue mayor. Ello indica que el plomo aumentó el número de ratas infértiles al estar presentes las hormonas levonogestrel y etinil estradiol. No se han encontrado reportes relacionados con el efecto de la combinación de las hormonas estudiadas en este trabajo y

el plomo, sin embargo, se puede proponer que los efectos teratogénicos del metal y los anticonceptivos de las hormonas pudieron sinergizarse ocasionando que el 50% de los animales no tuviera crías.

Dos ratas preñadas del grupo hormona + plomo disminuyeron su ingesta de comida, este podía ser un factor detonante en la disminución del número de crías. En 1979 se reportó que en un grupo de ratas a las cuales se les administró una solución de 100 µg de plomo por litro de agua durante todo el embarazo, se detectó bajo peso fetal posiblemente debido a la disminución de ingesta de alimento de las madres. Un año antes, en 1978 un estudio en ratones hembra a las cuales se les administró plomo a un porcentaje del 5% en su comida durante el periodo de 8 a 18 días de gestación presentaron reducción del flujo sanguíneo placentario, lo que trajo consigo graves efectos fetales. En 1983 un estudio verso en administrar vía intravenosa a ratones nitrito de plomo en los días 8 a 18 de gestación observándose que la distribución inició en la sangre fetal y después en el hígado y en el esqueleto de las crías. De igual manera se han relacionado los efectos en los fetos a la deficiencia de calcio, la cual está directamente relacionada con la intoxicación por plomo (Eisenmann y Miller, 1996).

## **8.6 EXAMEN GENERAL DE ORINA DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.**

Una forma de detectar diversos estados de enfermedad es mediante el uso del uroanálisis, esta técnica es auxiliar en la detección de enfermedades metabólicas o sistémicas que afectan la función renal, los desórdenes endócrinos y enfermedades o desórdenes del tracto urinario. La tabla 6 muestra los resultados de la determinación de los analitos contenidos en las muestras de orina de los animales de los grupos de estudio.

En relación con el grupo control, el volumen urinario disminuyó aproximadamente 9 mL cuando los animales fueron intoxicados con plomo, indicando, posiblemente, un problema de retención de agua. De forma contaria, se observó un aumento de 7 mL cuando las ratas fueron tratadas con las hormonas esteroideas. Estos cambios comparados con las ratas no expuestas, además de la diferencia entre ambos fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ). El tratamiento conjunto con hormonas y plomo no ocasionó un cambio significativo. Los 3 grupos experimentales mostraron ligera proteinuria, siendo mayor en los grupos tratados con plomo y hormona + plomo, en comparación con el grupo control. Esto podrían indicar que existen daños a nivel glomerular, el cual es mayor en presencia de plomo y

cuando existe la combinación de este elemento y las hormonas. La gravedad específica, el valor de pH, la presencia de leucocitos, los nitritos, la glucosa y la sangre no estuvieron presentes en orina. Estos resultados ayudan a descartar problemas de tipo infeccioso, estados hemolíticos, ictericia mecánica, fiebre, acidosis tubular renal, trastornos electrolíticos, diabetes insípida, cetosis o glucosuria los cuales se producen por aumento o disminución de los mismos. La tabla 8 muestra la interpretación de cada una de los valores de analitos que se pueden obtener en el uroanálisis (Burtis, 1994., Henry, 2001).

**Tabla 8.** Examen general de orina de los grupos de estudio (n=6).

GRUPO	Volumen mL	Gravedad específica	pH	Leucocitos Leuco/ $\mu$ l	Nitritos	Proteína g/Dl	Glucosa mg/dL	Sangre
<b>CONTROL</b>	19.83 $\pm$ 3.46 <sup>a</sup>	1.01 $\pm$ 0.02	6.66 $\pm$ 1,50	N	N	N	N	N
<b>PLOMO</b>	10.18 $\pm$ 1.58 <sup>b</sup>	1.00	8.67 $\pm$ 1.58	N	N	0.9	N	N
<b>HORMONA</b>	26.16 $\pm$ 3.6 <sup>b,c</sup>	1.00 $\pm$ 0.01	8.08 $\pm$ 1.20	N	N	0.45 $\pm$ 0.3	N	N
<b>HORMONA + PLOMO</b>	18.50 $\pm$ 6.70	1.00	7.66 $\pm$ 1.12	N	N	0.9	N	N

**Tabla 9.** Interpretación de los valores de analitos determinados por el Examen General de Orina en los grupos de estudio (n=6).

	Valor	Interpretación de resultado.
<b>Leucocitos</b>	<5	↑ Leucocituria, infección de las vías urinarias
<b>Nitritos</b>	Negativo	↑ bacteriuria, infección de las vías urinarias
<b>Urobilinógeno</b>	0,1 a 1,0 mg/dL	↑ estados hemolíticos ↓ ictericia mecánica

<b>Proteínas</b>	0-4 mg/dL	↑ proteinuria prerrenal, glomerular, tubular o mixta.
<b>pH</b>	5 a 8.	↓ dieta rica en proteínas, fiebre ↑ dieta pobre en proteínas, acidosis tubular
<b>Sangre</b>	Negativo	
<b>Gravedad específica</b>	1.003 a 1.040 g/mL	↓ alteración de la función renal, diabetes insípida, trastornos electrolíticos, (hipercalcemia, hipopotasemia), hipo/hipertiroidismo ↑ glucosuria importante, fármacos (manitol, dextrano), medios radiológicos de contraste.
<b>Cetonas</b>	Negativo	↑ cetosis/cetoacidosis
<b>Bilirrubina</b>	Negativo	↑ ictericia parenquimatosa/mecánica, estados hemolíticos
<b>Glucosa</b>	Negativo	↑ diabetes descompensada, glucosuria tubular

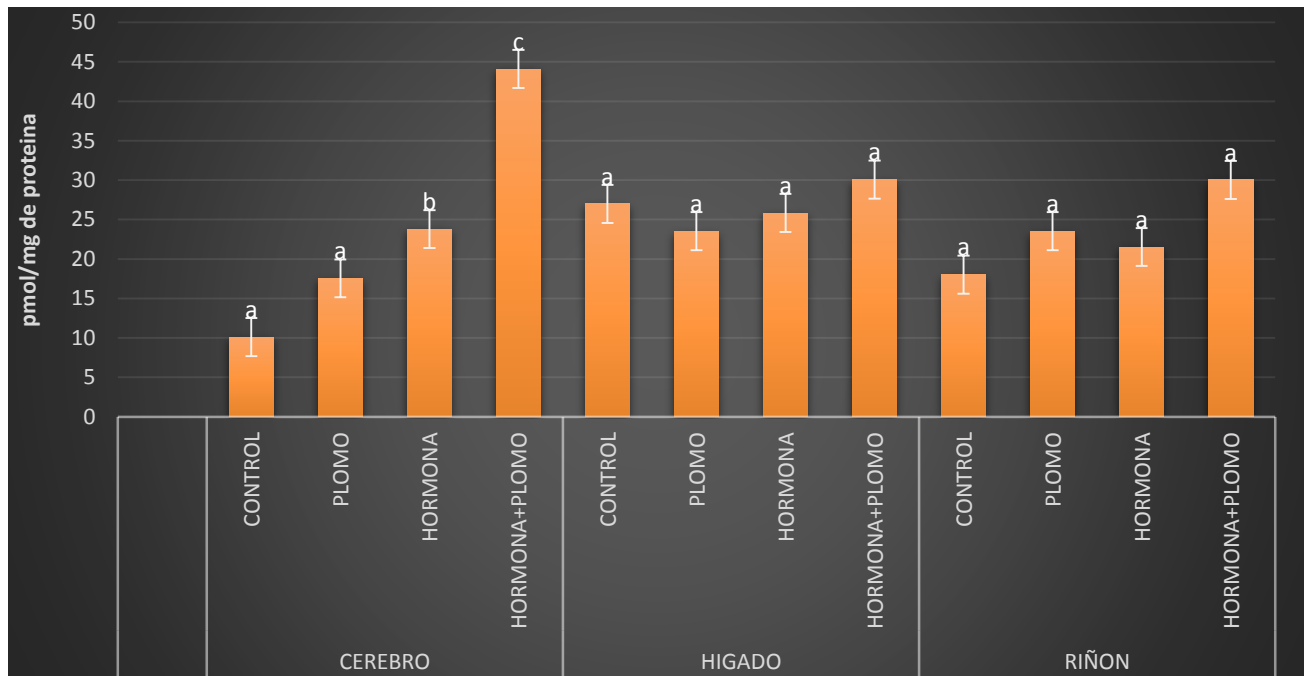
## 8.7 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO.

Uno de los principales problemas de la exposición a los metales pesados es la generación del estrés oxidativo, proceso que ocurre debido al desbalance que existe entre los sistemas antioxidantes y las especies reactivas de oxígeno. A continuación, se detallan los resultados.

### 1.1.1. ÓRGANOS.

El análisis estadístico de los resultados en los órganos indicó que, para los tres casos, las diferencias encontradas entre los grupos de estudio y el control fueron significativas con un valor de  $p < 0.05$ . El grupo que mostró mayor incremento en estas especies fue el de hormona + plomo. La figura 1 muestra los resultados obtenidos.

En los tres órganos se puede observar que el grupo tratado con hormona e intoxicado con plomo fue el que más aumento de especies reactivas de oxígeno provocó. Sin embargo, este comportamiento dependió del órgano de estudio.

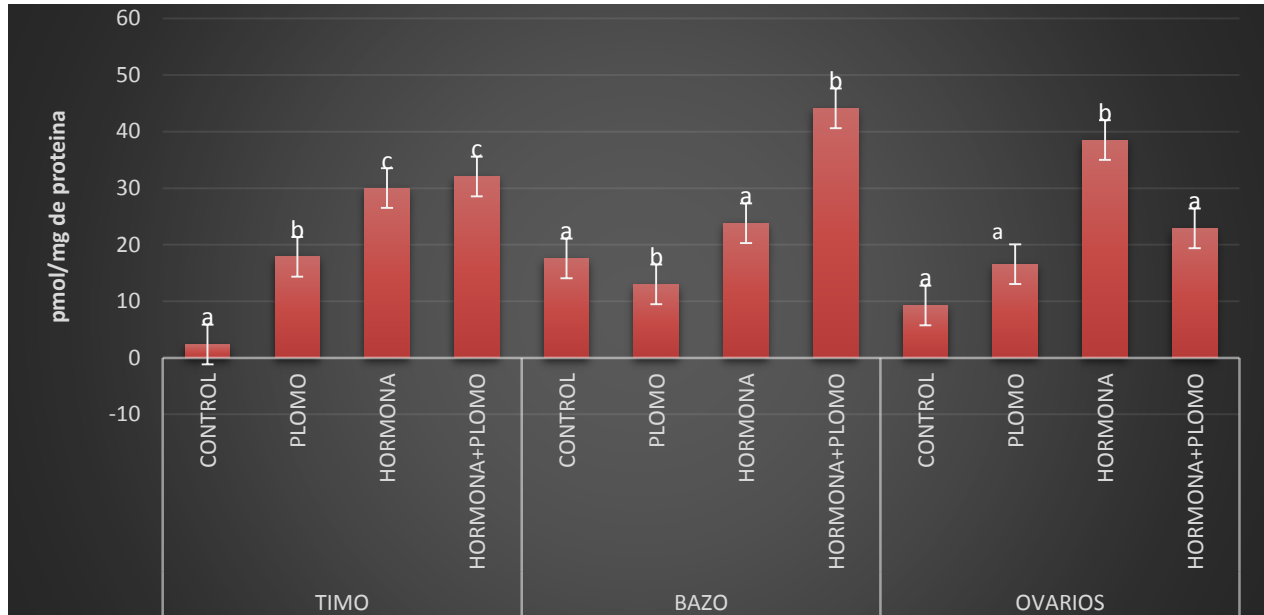


**Figura 9.** Especies reactivas de oxígeno en cerebro, hígado y riñón de los grupos de estudio (n=6).

En cerebro, los tres grupos experimentales mostraron incremento de especies reactivas de oxígeno. Todos los resultados fueron estadísticamente significativos con una  $p < 0.05$ . al comparar los grupos con el control ( $10.10 \pm 4.5$ ), se observó que el plomo ocasionó un incremento de 7.6 unidades pmolMDA/mg ( $17.55 \pm 5.22$ ), las hormonas produjeron un aumento de 13.8 unidades pmolMDA/mg ( $23.8 \pm 2.90$ ) y el grupo hormona + plomo incrementó la actividad 34 unidades pmolMDA/mg ( $44.1 \pm 11.12$  pmoMDA/mg de proteína). En el hígado al realizar la comparación de los grupos experimentales contra el control, no se observaron diferencias significativas, sin embargo, comparando los grupos plomo y hormona + plomo se pudo ver diferencia, siendo el segundo grupo el que mostró mayor concentración de especies reactivas. En el caso del riñón, no se observó incremento de EROS ni en el grupo expuesto a plomo como el expuesto a hormonas al ser comparados con el grupo no expuesto. No obstante, cuando se analizaron los datos del grupo hormona + plomo se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de 12 unidades pmolMDA/mg en comparación con el grupo control ( $30.03 \pm 6.75$  vs  $18.02 \pm 1.53$  pmol/mg de proteína, respectivamente).

### 8.7.1 GLÁNDULAS.

La figura 2 muestra la concentración de EROS en las glándulas de las ratas Wistar de cada grupo. En este caso, las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.05$ .



**Figura 10.** Especies reactivas de oxígeno en timo, bazo y ovarios de los grupos de estudio (n=6).

En el caso del timo, los tres grupos aumentaron la cantidad de EROS en relación con el grupo control ( $2.38 \pm 4.04$ ). El plomo incrementó 15.5 unidades pmolMDA/mg ( $17.88 \pm 5.3$ ); el grupo hormona mostró un aumento de 28 unidades pmolMDA/mg ( $30.03 \pm 6.75$ ) y el de hormona + plomo mostró un aumento de 30 unidades pmolMDA/mg ( $32.06 \pm 3.7$  pmol/mg de proteína). En el caso del bazo, solo en el grupo hormona + plomo se observó un aumento de 27 unidades pmolMDA/mg de especies reactivas al ser comparado con el grupo no expuesto ( $44.11 \pm 11.56$  vs  $17.6 \pm 1.87$  pmol/mg de proteína, respectivamente). En los ovarios los tres grupos expuestos mostraron incremento en la cantidad de EROS. El plomo incrementó 7 unidades pmolMDA/mg ( $16.56 \pm 8.2$ ); el grupo hormona se detectó un aumento de 29 unidades pmolMDA/mg ( $38.54 \pm 17.05$ ) y el grupo hormona + plomo presentó 13 unidades pmolMDA/mg ( $22.91 \pm 3.9$ ) de aumento con respecto al control ( $9.24 \pm 4.96$  pmol/mg de proteína).

Los resultados anteriores muestran que el plomo y las hormonas, por separado no generaron un nivel de especies reactivas en cerebro, rin, timo y bazo mayor al observado en el grupo hormona + plomo.

En Cerebro, timo y ovarios aumentaron las especies reactivas de oxígeno ocasionadas por la intoxicación con plomo, pero no a niveles mayores a los grupos hormona y hormona + plomo. Los anticonceptivos incrementaron los EROS en cerebro, timo y ovarios.

El grupo hormona + plomo fue el que presentó el 50 % de infertilidad. Cuando se observó el efecto del plomo, las hormonas y la combinación de hormonas + plomo se observó que en los tres casos aumentaron los EROS en los ovarios. Este efecto podría haber influido en la disminución en la gestación. Cuando las ratas fueron tratadas con hormonas anticonceptivas el 33% de la población no se embarazó y el número de crías de las hembras que si parieron disminuyeron en relación con el grupo control. El plomo ocasionó menor número de crías y la muerte de una rata embarazada. El timo también curso por aumento de EROS. Posiblemente tanto el plomo como las hormonas anticonceptivas sinergizaron sus efectos incrementando el nivel de EROS y por ello ocasionar que el proceso de gestación disminuyera al 50%.

En relación con lo anterior, se sabe que los estrógenos per se, son antioxidantes ya que poseen un anillo fenol, el cual puede actuar como un barredor de radicales libres y, a la vez, le permite donar un átomo H<sup>+</sup>. Esta propiedad le facilita el intervenir en diferentes etapas de la oxidación lipídica. Estudios *in vitro* han evidenciado la capacidad antioxidativa de los estrógenos. Se ha evidenciado que los diferentes estrógenos y sus metabolitos poseen distintas capacidades antioxidativas. En un estudio comparativo *in vitro* entre algunos tipos de estrógenos, se logró clasificar la capacidad antioxidativa de mayor a menor, de lagunas hormonas: estradiol > estrona > equilin > estriol. Se han clasificado los estrógenos equinos como los de mayor capacidad antioxidativa, el estradiol y la estrona, junto a sus metabolitos catecol, han mostrado capacidad antioxidativa en concentraciones micromolares, en tanto los metabolitos metoxi mostraron la misma capacidad antioxidativa a concentraciones de picomolares. Los metabolitos estrogénicos, catecolestrógenos y metoxiestrógenos, además de funcionar como barredores de radicales libres, también lograron reducir y mantener reducidas las moléculas de Fe y Cu, lo cual previene que estas moléculas actúen como oxidantes. Otro estudio ha evidenciado que el estradiol es igual de efectivo que la vitamina E, en prevenir la oxidación de LDL e igual o más efectivo que las enzimas Súper óxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT). Los estrógenos no solo participan como antioxidantes, sino que también pueden modificar los niveles y capacidades de los mecanismos oxidativos y antioxidativos del cuerpo. El estradiol puede disminuir la producción de

radicales libre inducido por la angiotensina II en cultivos celulares de músculo liso. El estradiol aumenta la transcripción, expresión y actividad de MnSOD y de ecSOD, sin afectar los niveles o actividad de la Cu-ZnSOD, GSHPX ni catalasa (Escalante Gómez, 2009).

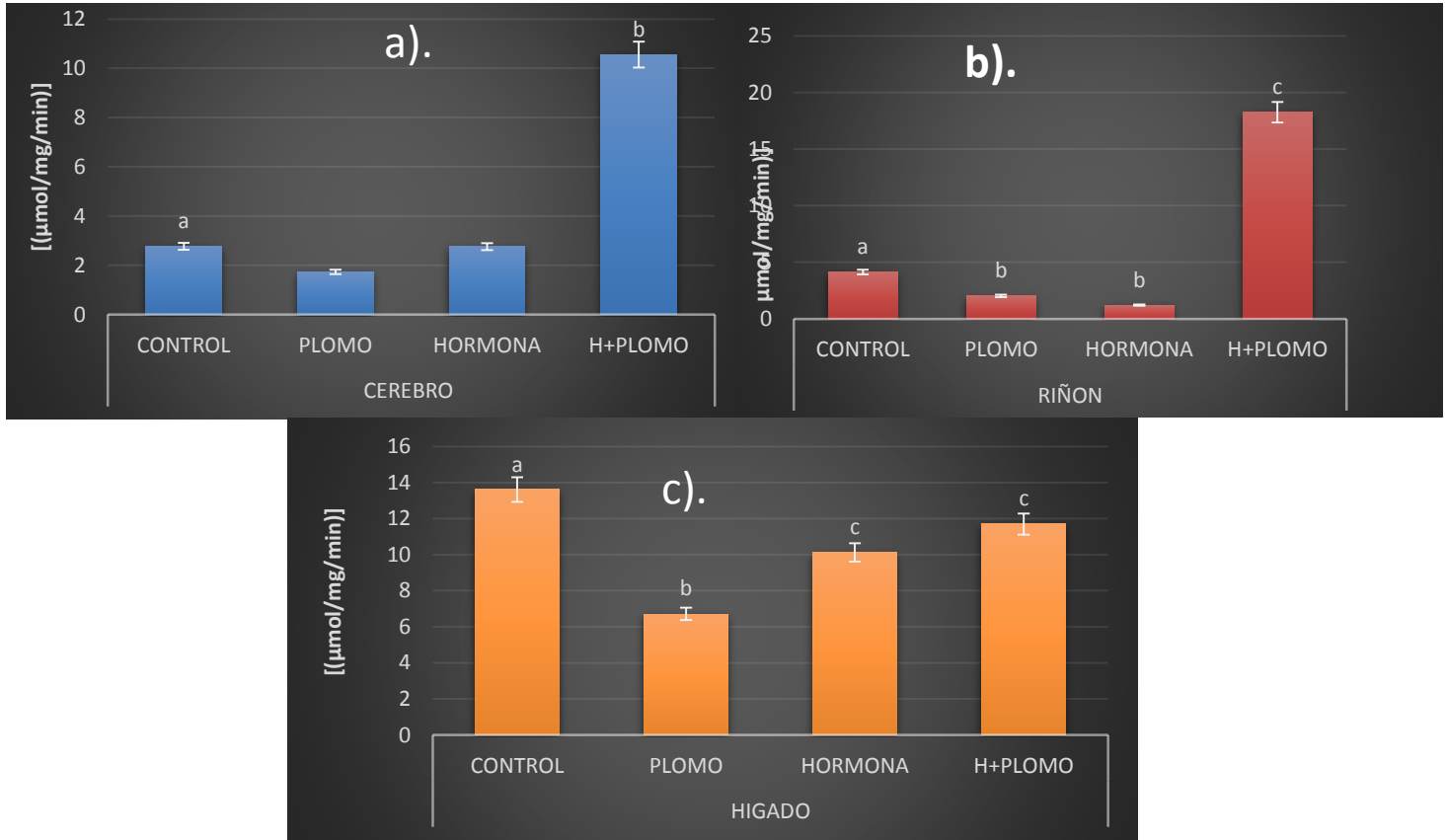
En la bibliografía, solo se encontró un estudio en el cual se relacionó el uso de anticonceptivos orales y la generación de estrés oxidativo. En ese reporte se trabajó con 144 mujeres blancas, jóvenes y atletas de varias disciplinas. Los autores del trabajo mencionaron que los niveles de estrés oxidativo (determinado como la concentración de hidroperóxidos) variaron considerablemente en función del uso de los anticonceptivos orales. No se sabe cómo se generan los hidroperóxidos, sin embargo, ellos proponen que el catabolismo de las hormonas, el cual involucra al Citocromo P450, puede provocar el incremento de la producción de EROS, así como la disminución del glutatión reducido (GSH). Este grupo también mencionó que en células en cultivo tratadas con estradiol se observó un aumento de la lipoperoxidación. De la misma forma se reportó que los estrógenos se encuentran inversamente relacionados a la defensa antioxidante, de tal forma que altas concentraciones de estrógenos se han relacionado con la disminución de la enzima Superóxido dismutasa (SOD) en sangre. No obstante estudios llevados por otros grupos de investigación, en ratas, han demostrado resultados contrarios, en los que mencionan que no hay inhibición de la actividad de la enzima, pero si incremento en los niveles de lipoperoxidación (Causi, et. al, 2016).

## **8.8 ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST) EN ORGANOS, GLANDULAS Y FLUIDOS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.**

### **8.8.1 ÓRGANOS.**

La figura 3 inciso a). muestra los resultados obtenidos en cerebro, hígado y riñón de los grupos de estudio. En los casos donde se marca diferencia, esta fue significativa y se obtuvieron valores de  $p < 0.05$ . En cerebro se observó un ligero descenso de la actividad, pero no fue significativo; en el caso del grupo hormona + plomo la actividad aumentó 8 unidades en relación con el grupo control ( $10.56 \pm 1.32$  vs  $2.77 \pm 0.85$  respectivamente). En el hígado el plomo disminuyó 7 unidades  $\mu\text{molDNCB}/\text{mg}/\text{min}$  la actividad ( $6.72 \pm 3.2$ ); las hormonas anticonceptivas bajaron la actividad 3.5 unidades  $\mu\text{molDNCB}/\text{mg}/\text{min}$  ( $10.13 \pm 0.23$ ) y las hormonas + plomo disminuyeron 2 unidades  $\mu\text{molDNCB}/\text{mg}/\text{min}$  la actividad ( $11.7 \pm 6.77$ ) con relación al grupo control ( $13.61 \pm 7.98$   $\mu\text{molDNCB}/\text{mg}/\text{min}$ ). Finalmente, en el riñón tanto el plomo como el tratamiento hormonal disminuyeron la actividad de la enzima 2.1 y 3 unidades  $\mu\text{molDNCB}/\text{mg}/\text{min}$ . ( $2.13 \pm 0.60$  y  $1.21 \pm$

0.50 respectivamente) en relación con el grupo control. El grupo tratado con hormona + plomo mostró un incremento de aproximadamente 14 unidades de actividad ( $18.25 \pm 1.40$ ) en relación con el grupo no expuesto ( $4.13 \pm 0.54 \mu\text{molDNCB/mg/min}$ ).



**Figura 11.** Actividad de GST en cerebro, hígado y riñón en los diferentes grupos de estudio

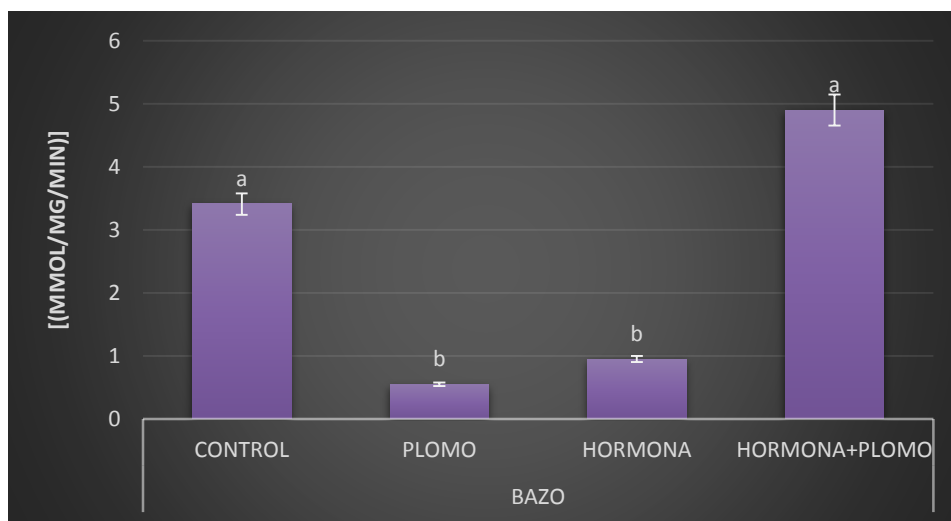
El plomo inhibió la actividad de la GST de hígado y riñón, no así en cerebro, sin embargo, el metal solo ocasionó la generación de EROS en cerebro y riñón, lo cual indica que en este caso la relación encontrada entre plomo-EROS-actividad de GST no se cumplió como en el caso de lo observado en riñón de ratas macho Wistar intoxicadas con plomo (Hernández, 2015). Por lo que el incremento en la actividad de GST puede deberse a procesos no relacionados con el estrés oxidativo. En el caso del grupo hormona, solo se produce aumento de EROS en cerebro sin que aumente la actividad de la enzima; en el caso del hígado y el riñón no hay aumento de las especies reactivas de oxígeno y

posiblemente debido a ello no hay aumento de la actividad enzimática. Sin embargo, se requieren de más estudios para poder afirmar lo anterior. El tratamiento hormona + plomo generó aumento de la actividad de GST en cerebro y riñón y aumento de EROS en los tres órganos. Posiblemente este aumento se debió al estrés oxidativo y a la actividad de la enzima como detoxificador de xenobióticos. En el caso del hígado la presencia de EROS aumentó y la actividad de GST disminuyó. Se debe considerar que son ratas que han pasado por un proceso de gestación o a las que se les ha administrado un tratamiento hormonal y que además se encuentran en presencia de plomo. Cada órgano tiene sus mecanismos de defensa ya sean antioxidantes y/o de xenobióticos, por ello, posiblemente, la actividad de la enzima varió en función del esquema de tratamiento y del órgano.

### **8.8.2 GLÁNDULAS.**

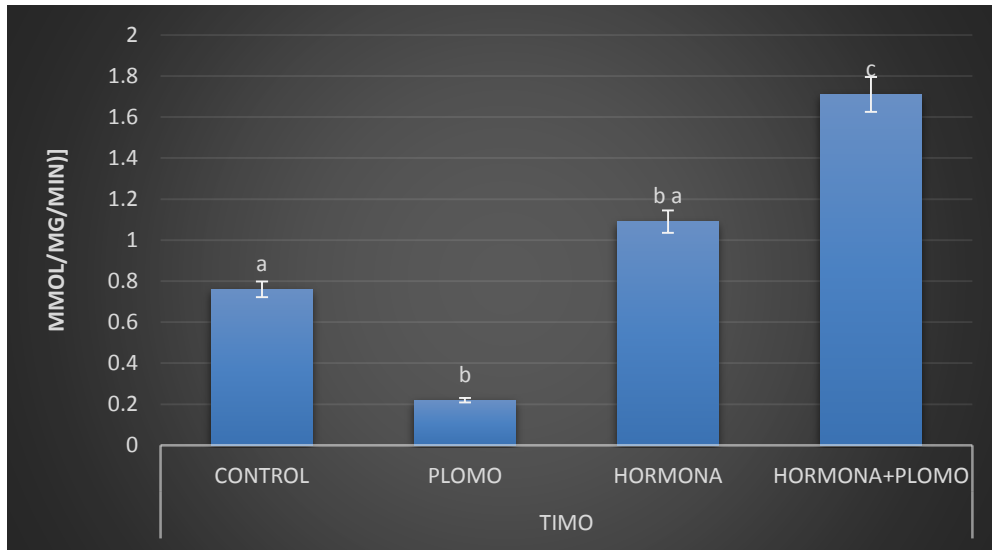
La figura 12 muestra los resultados encontrados en bazo. Todas las diferencias encontradas fueron significativas con una  $p < 0.005$ . El plomo y las hormonas disminuyeron 2.9 y 2,5 unidades de actividad ( $0.55 \pm 0.09$  y  $0.95 \pm 0.09$  respectivamente), mientras que la combinación hormona + plomo ( $4.9 \pm 0.7$ ) la aumentó 1.5 unidades con respecto al control ( $3.41 \pm 0.48 \mu\text{mol/mg/min}$ ).

La figura deja ver que en el caso del plomo la inhibición de la actividad enzimática no se debió a la presencia de especies reactivas de oxígeno, ya que el plomo, en esta glándula no los produjo, posiblemente la inhibición se llevó a cabo por un efecto directo del metal. Las hormonas también ocasionaron la disminución de la actividad, pero en este caso si existió la generación de EROS, por lo cual esta disminución no se relaciona, de nueva cuenta al estrés oxidativo. Cuando los animales son tratados con hormonas y plomo la actividad y la generación de EROS aumentan, este resultado podría indicar que el plomo potencia la actividad de las hormonas como generadoras de especies reactivas de oxígeno y que, además, al estar presentes las hormonas, la enzima aumenta su actividad por inducción de los EROS y para poder cumplir con su papel detoxificante.



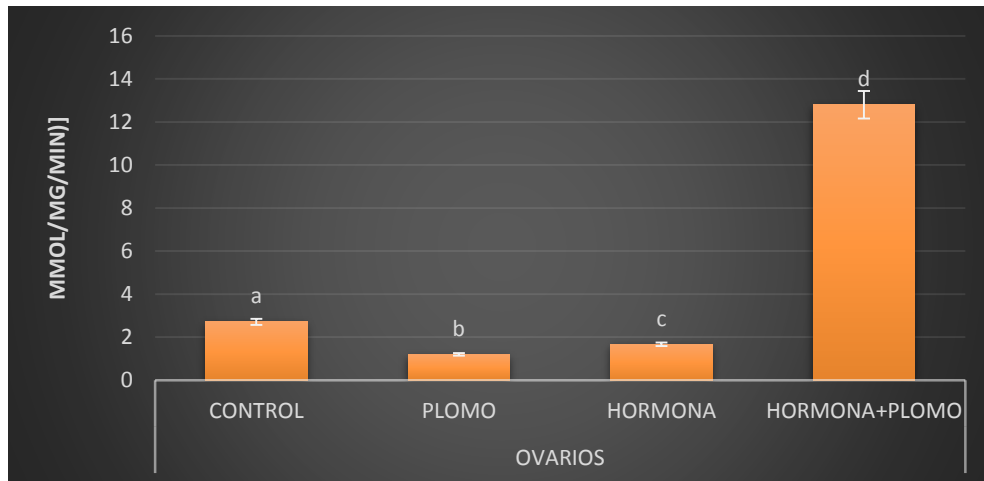
**Figura 12.** Actividad de GST en la glándula bazo de los diferentes grupos de estudio (n=6).

La figura 13 muestra la actividad de GST en Timo, las diferencias encontradas fueron significativas con una  $p < 0.005$ . La exposición a plomo inhibió la actividad en 0.54 unidades ( $0.22 \pm 0.01$ ), mientras que en el grupo hormona y hormona + plomo se observó un aumento de 0.33 y 0.95 unidades respectivamente ( $1.09 \pm 0.32$  y  $1.71 \pm 0.10$ ) con respecto al grupo control ( $0.76 \pm 0.08 \mu\text{mol/mig/min}$ ). En el caso del grupo intoxicado con plomo hubo un incremento de EROS, pero la actividad de la enzima se inhibió. Esto también, como en el caso del riñón de las ratas embarazadas, no sigue la relación encontrada en ratas Wistar macho. La acción del plomo, entonces podría deberse a un efecto directo del ión sobre la enzima. En los grupos hormona y hormona + plomo la actividad de la enzima aumentó al igual que las especies reactivas de oxígeno. Posiblemente el aumento de actividad se debió a que, como se ha mencionado anteriormente, las hormonas anticonceptivas pueden aumentar el estrés oxidativo y la lipoperoxidación y a que siendo las hormonas xenobióticos, la enzima actúa como detoxificante aumentando su actividad de enzima de la fase 2 del metabolismo de los xenobióticos.



**Figura 13.** Actividad de GST en el bazo de los diferentes grupos de estudio (n=6).

La figura 14 muestra los resultados de la actividad de GST en los ovarios; las diferencias encontradas fueron significativas con una  $p < 0.05$ .



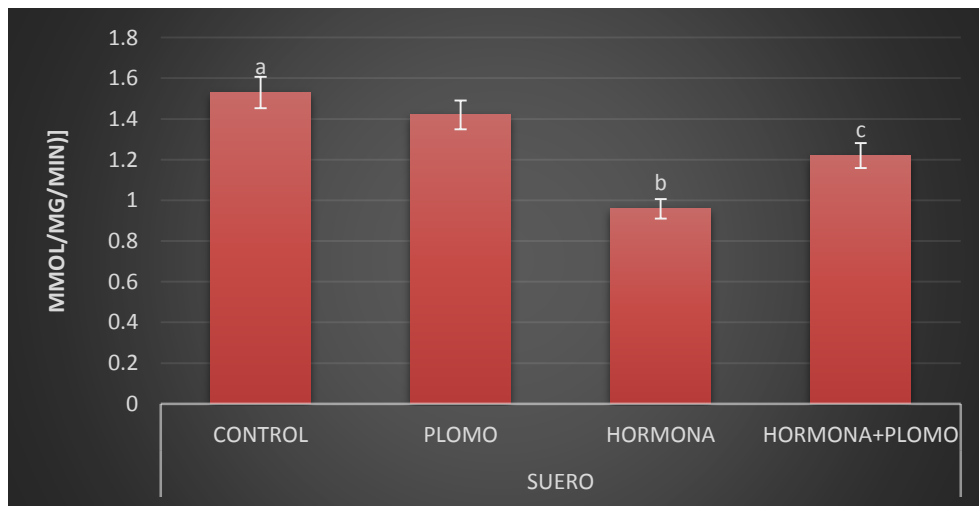
**Figura 14.** Actividad de GST en los ovarios de los diferentes grupos de estudio (n=6).

En este caso, el plomo y las hormonas disminuyeron la actividad de la enzima 1,5 y 1.1 unidades ( $1.2 \pm 0.08$  y  $1.67 \pm 0.03$  respectivamente). La combinación de hormona + plomo ocasionó un aumento de 10 unidades ( $12.8 \pm 0.76$ ) en relación con el grupo control ( $2.71 \pm 0.02 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ ).

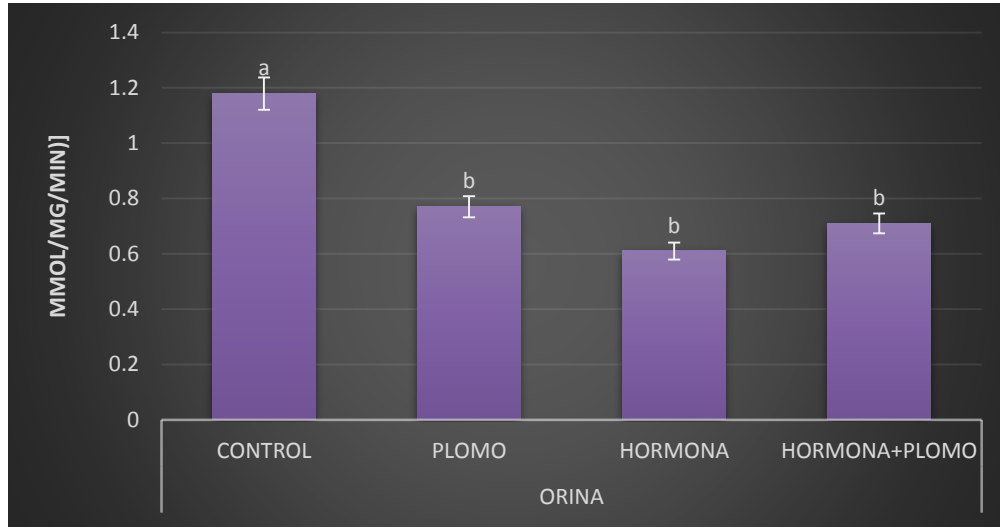
### 8.8.3 FLUIDOS.

Se determinó la actividad de la enzima en suero y en orina, debido a que en el caso de las ratas macho de la cepa Wistar se ha detectado que existe una relación directa entre la actividad de GST en el órgano y en los fluidos mencionados. La figura 7 muestra la determinación de la actividad en el suero. Las diferencias encontradas fueron significativas con un valor de  $p < 0.05$ . La actividad de GST permaneció sin cambios en presencia de plomo; disminuyó 0.6 unidades ( $\mu\text{molDCB}/\text{mg}/\text{min}$ ). En el grupo tratado con hormona y decreció 0.3 unidades en el grupo hormona + plomo ( $0.96 \pm 0.10$  y  $1.22 \pm 0,85$ ) en relación con el grupo control ( $1.53 \pm 0.06 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ ). Solo en el grupo hormona + plomo se conservó la relación.

La figura 8 muestra la actividad de GST en las muestras de orina de los diferentes grupos. En los grupos tratados y expuesto a aplomo se observó una disminución estadísticamente significativa con una  $p < 0.05$ . el plomo ocasionó una disminución de 0.41 unidades( $\mu\text{molDCB}/\text{mg}/\text{min}$ ); las hormonas disminuyeron la actividad de GST 0.51 unidades( $\mu\text{molDCB}/\text{mg}/\text{min}$ ) y el grupo hormona + plomo 0.46 unidades ( $0.77 \pm 0.23$ ,  $0.61 \pm 0.15$  y  $0.71 \pm 0.10$  respectivamente) en relación con el grupo control ( $1.18 \pm 0.13 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ ).



**Figura 15.** Actividad de GST en suero de los diferentes grupos de estudio (n=6).



**Figura 16.** Actividad de GST en orina de los diferentes grupos de estudio (n=6).

No se encontró correlación entre la actividad determinada entre los dos fluidos con lo sucedido en el riñón de los animales de los diferentes grupos, no obstante, se debe tener en cuenta que las muestras de orina que se determinaron no solo eran las de la madre, sino también las de los fetos y que no sólo es un producto. Por ello, es lógico que los resultados no correspondan. En este caso la determinación de la actividad de la GST en suero o en orina no podría usarse como un bioindicador de daño ocasionado por la presencia de plomo en ratas embarazadas o en presencia de plomo en ratas sometidas a un tratamiento con anticonceptivos hormonales de tipo oral.

El estudio de este tipo de esquemas de intoxicación es un fenómeno complejo que requiere de más evaluaciones adicionales. Sin embargo, se ha encontrado que algunos tipos de GST tienen funciones similares a la enzima Glutatión peroxidasa (GPx), catalizando la conversión de peróxidos orgánicos a alcoholes, con intervención de glutatión reducido (GSH) y la producción de glutatión oxidado (GSSG), contribuyendo, de esta manera, a la protección contra la peroxidación. En estudios realizados en cerdos, la actividad promedio de GST fue de 0.0036 y 0.0045 U mg<sup>-1</sup> de proteína en el primer y segundo o tercer parto, respectivamente; es decir, la actividad de la enzima aumentó con el número de embarazos. Se ha observado mayor actividad de GST en relación al número de gestas. Se ha reportado,

también, que al final del embarazo existe un incremento de la lipoperoxidación, por un cambio en el perfil lipídico (incremento de triglicéridos fácilmente oxidables), y un consecuente decremento en la concentración de GSH, el cual es un antioxidante y además contribuye a la actividad de las enzimas GPx y GST. Estas enzimas han sido relacionadas con la conversión de peróxidos orgánicos, disminuyendo la lipoperoxidación de moléculas. Un aumento en el número de gestas puede incrementar la lipoperoxidación de la leche materna. La respuesta fisiológica del organismo para contrarrestar el daño oxidativo incluye un incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes, en este caso principalmente de la GST. Esta enzima se conoce también por su función detoxificante, ya que se encuentra relacionada con el metabolismo de xenobióticos, los cuales son metabolizados mediante una reacción de conjugación con el GSH. Por lo tanto, el incremento en la actividad de GST puede estar asociado a la concentración de xenobióticos presentes en el tejido adiposo de la madre. En el caso de los metales pesados y los plaguicidas, se sabe que se acumulan en el tejido adiposo y después son liberados a través de la movilización de lípidos requerida para la producción de leche (Castillo-Castañeda, et. al, 2014).

A continuación, se resumen los resultados obtenidos en cada grupo.

El plomo no ocasionó aumento de peso corporal y solo el hígado, el bazo y el timo presentaron anomalías en el periodo de intoxicación. El número de crías y el peso de las mismas fue similar al del grupo control y de la misma manera el 100% de las hembras resultaron preñadas. Sin embargo, una de las ratas murió durante el proceso de gestación en presencia del metal, posiblemente por ser más susceptible que las demás. Las madres presentaron proteinuria y aumento de volumen urinario. Solo en cerebro, timo y ovarios se detectó incremento de EROS. La GST aumentó su actividad en el hígado mientras que, en riñón, bazo, ovarios y orina disminuyó.

El grupo tratado con hormona tampoco aumentó de peso y solo se detectaron hubo efectos en el peso de bazo y timo. El número de crías y el peso de las mismas disminuyó en relación con el grupo control y el 33% de las hembras no se embarazó. Al igual que en el grupo expuesto a plomo, se detectó proteinuria y aumento de volumen urinario. Los EROS también aumentaron solo en cerebro, timo y bazo, mientras que la GST solo aumentó su actividad en el hígado.

El grupo hormona + plomo presentó aumento de peso corporal y un efecto en el tamaño del riñón. El 50 % de la población no quedó embarazada y el número de crías, así como su peso fueron menores a los dos grupos anteriores y al control. Se presentó proteinuria. Se detectó incremento de EROS en cerebro, riñón, timo, bazo y ovarios. La actividad de la GST fue mayor al grupo control en los órganos cerebro, hígado y riñón, así como en los ovarios. El tiempo de gestación también se vio alterado ya que en los grupos control y expuesto a plomo este fue de 23 días, para los grupos hormona y hormona + plomo éste fue de 28.

## **9 CONCLUSIONES**

Se ha mencionado mucho que el plomo tiene muchos efectos adversos sobre la salud del humano. Sin embargo, se sabe que los daños se encuentran en prácticamente todos los seres vivos. Es impresionante encontrar literatura en la que los estudios indiquen que hay disminución del número de huevos y, por ende, de nacimientos cuando las aves crecen en ambientes en donde las concentraciones de este elemento son elevadas. Esto quiere decir que el proceso de desarrollo de la vida se encuentra comprometido a llevarse a cabo en ambientes libres de plomo y de otros metales o diferentes contaminantes.

En este trabajo se usaron tres esquemas experimentales, el primero de ellos se fundamentó en el estudio de la exposición a plomo en ratas que quedaron preñadas, desarrollaron su embarazo y parieron, continuando con un mes de amamantamiento en presencia del metal; el segundo grupo fue tratado con hormonas anticonceptivas orales para analizar su efecto en la gestación de los animales; finalmente el tercer grupo fue tratado al mismo tiempo con hormonas anticonceptivas y plomo para estudiar el efecto que podría generarse en este caso. Los resultados indicaron que este último grupo fue el que mostró resultados más sobresalientes que los dos grupos anteriores.

El proceso de gestación es multivariante e implica la participación de muchas hormonas y requiere de la interconexión metabólica del feto y de la madre de forma coordinada. Resulta complicado estudiar el efecto de los tóxicos en el embarazo debido a que en este se conjugan factores propios de la madre y del feto. La madre se comunica con el feto a través del cordón umbilical y es por donde le transmite los nutrientes necesarios para que se desarrolle. Este conducto y la placenta constituyen mecanismos

de transporte de moléculas y elementos necesarios para el desarrollo del feto. Sin embargo, también constituyen sistemas de transporte de agentes tóxicos. La concentración de plomo utilizada en este ensayo (1000 ppm) administrada por vía oral no afectó el proceso de gestación de forma alarmante posiblemente porque el periodo de estudio fue corto, o la concentración no resultó muy tóxica. Cuando se administró el tratamiento hormonal, se observó que el 66% tuvo crías, no obstante, el número y el peso de las mismas disminuyó en relación tanto con el control como con el grupo expuesto a plomo. Lo anterior pudo haber sucedido, posiblemente, por el aumento de EROS y la disminución de la enzima GST en los ovarios. Cuando se combinaron los dos factores anteriores, hormonas y plomo los resultados fueron totalmente diferentes. En este caso el 50% de la población no se embarazó, se detectó aumento de peso de las hembras y el número y peso de las crías bajó de forma considerable. El periodo de gestación se alargó a diferencia de los reportes que indican que el tratamiento con anticonceptivos orales puede ocasionar disminución del periodo de gestación. El nivel de EROS aumentó en todas las glándulas y en riñón y cerebro. La GST incrementó su actividad en todos los órganos y en los ovarios. En este caso la combinación de las hormonas levonogestrel y etinil estradiol con el plomo incrementaron los efectos bioquímicos y fisiológicos de las hembras en etapa de gestación. Se sabe que las hormonas pueden aumentar los niveles de EROS y en riñón, el plomo tiene el mismo efecto. En el grupo hormona + plomo se generó aumento de EROS en los tres grupos experimentales pero el efecto se incrementó en el último grupo. Ello pudo ocasionar, junto con otros fenómenos adjuntos a la presencia de hormonas y plomo que, en este caso, los efectos fueran más notorios. Todo ello puede soportar la idea de que la sinergia entre las hormonas anticonceptivas orales y la intoxicación con plomo afectan el proceso de gestación de las ratas Wistar.

## **10 PERSPECTIVAS**

Después de desarrollar el presente trabajo de investigación y al analizar los datos obtenidos, se pudieron plantear las siguientes perspectivas.

1.- Estudiar el efecto de diferentes concentraciones de plomo y de las hormonas levonogestrel y etinil estradiol sobre el proceso de gestación y en las crías obtenidas.

2.- Evaluar los efectos del plomo y las hormonas anticonceptivas en diferentes esquemas de experimentación para ahondar sobre el efecto del plomo sobre los efectos de las hormonas o sobre las hormonas y sus efectos sobre la intoxicación con plomo.

3.- Investigar el efecto del plomo sobre los perfiles hormonales de las ratas que cursan por el proceso de gestación.

4.- Estudiar los efectos de la exposición a plomo, a hormonas y a hormonas + plomo sobre los distintos órganos tanto de las madres como de las crías.

5.- Evaluar el efecto de los diferentes esquemas de investigación sobre el metabolismo de iones esenciales para el desarrollo de las crías como el calcio.

6.- Realizar estudios histológicos de las glándulas y los órganos de estudio en los diferentes grupos experimentales.

## 11 REFERENCIAS

- Anaya-Prado, R., Madrigal-Flores, S., Reveles-Vázquez, JA, Ramírez-Barba, É. J., Frías-Terrones, G., & Godínez-Rubí, JM (2008). Morbilidad materna asociada a operación cesárea. *Cirugía y cirujanos*, 76 (6), 467-472.
- Azcona-Cruz, M. I., Ramírez, R., & Vicente-Flores, G. (2015). Efectos tóxicos del plomo. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 20(1), 72-77.
- Azcona-Cruz, M. I., Rothenberg, S. J., Schnaas-Arrieta, L., Romero-Placeres, M., & Perroni-Hernández, E. (2000). Niveles de plomo en sangre en niños de 8 a 10 años y su relación con la alteración en el sistema visomotor y del equilibrio. *salud pública de méxico*, 42, 279-287.
- Bashash, M., Thomas, D., Hu, H., Angeles Martinez-Mier, E., Sanchez, BN, Basu, N., ... & Liu, Y. (2017). Exposición prenatal al fluoruro y resultados cognitivos en niños de 4 y 6 a 12 años en México. *Perspectivas de salud ambiental*, 125 (9), 097017.
- Beattie, AD, Briggs, JD, Canavan, JSF, Doyle, D., Mullin, PJ y Watson, AA (1975). Envenenamiento agudo por plomo: cinco casos resultantes de la autoinyección de plomo y opio. *QJM: An International Journal of Medicine*, 44 (2), 275-284.
- Blackburn, EH (2000). Estados teloméricos y destinos celulares. *Naure*, 408 (6808), 53.
- Calleja, C. E., & Ramírez, E. (2014). Interpretación del contenido de mercurio en muestras nacionales de pez vela (*Istiophorus platypterus*) y marlin (*Makaira* spp. o *Tetrapturus* spp.) a partir de parámetros toxicológicos internacionales. *Revista de Ciencias Ambientales*, 47(1), 44-59.
- Cao, J. y Zhou, D. (1998). Análisis de estabilidad de redes neuronales celulares retrasadas. *Redes neuronales*, 11 (9), 1601-1605.
- Caravanos, J., Dowling, R., Téllez-Rojo, M. M., Cantoral, A., Kobrosly, R., Estrada, D., ... & Fuller, R. (2014). Niveles de Plomo en Sangre en México y su Implicación para la Carga Pediátrica de la Enfermedad. *Annals of global health*, 80(4), e1-e11.
- Caravanos, J., Dowling, R., Téllez-Rojo, M. M., Cantoral, A., Kobrosly, R., Estrada, D., ... & Fuller, R. (2014). Niveles de Plomo en Sangre en México y su Implicación para la Carga Pediátrica de la Enfermedad. *Annals of global health*, 80(4), e1-e11.
- Castro-Bedriñana, J., Chirinos-Peinado, D., & Ríos-Ríos, E. (2013). Niveles de plomo en gestantes y neonatos en la ciudad de la Oroya, Perú. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 30(3), 393-398.
- Claus Henn, B., Bellinger, DC, Hopkins, MR, Coull, BA, Ettinger, AS, Jim, R., ... & Wright, RO (2017). Concentraciones de manganeso en sangre materna y de cordón umbilical y neurodesarrollo en la primera infancia entre residentes cerca de un sitio de superfondo afectado por la minería. *Perspectivas de salud ambiental*, 125 (6), 067020.

Covarrubias, S. A., & Cabriales, J. J. P. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 7-21.

Crenshaw, J. T. (2014). Healthy birth practice# 6: Keep mother and baby together—It's best for mother, baby, and breastfeeding. *The Journal of perinatal education*, 23(4), 211-217.

Doumouchtsis, SK y Arulkumaran, S. (2010). La placenta mórbidamente adherente: una visión general de las opciones de manejo. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 89 (9), 1126-1133.

Estrada Cherres, J. P., & Ulloa Castro, A. (2018). Diagnóstico del virus del papiloma humano en mujeres en edad fértil del área de salud No. 1 de Azogues, Ecuador. *Revista Información Científica*, 97(1), 19-28.

Ettinger, AS, Roy, A., Amarasiriwardena, CJ, Smith, D., Lupoli, N., Mercado-García, A., ... y Hernández-Avila, M. (2014). Sangre materna, plasma y plomo en la leche materna: transferencia de lactancia y contribución a la exposición infantil. *Perspectivas de salud ambiental*, 122 (1), 87-92.

Flora, G., Gupta, D. y Tiwari, A. (2012). Toxicidad del plomo: una revisión con actualizaciones recientes. *Toxicología interdisciplinaria*, 5 (2), 47-58.

García-López, R. (2011). Composición e inmunología de la leche humana. *Acta pediátrica de México*, 32(4), 223-230.

García-Núñez, L. M., Magaña-Sánchez, I. J., Noyola-Villalobos, H. F., Belmonte-Montes, C., & Rosales-Montes, E. (2017). Manejo con técnica de abdomen abierto en pacientes críticos. Experiencia de dos años en el Hospital Central Militar. *Revista de Sanidad Militar*, 57(4), 232-236.

Goyer, RA (1989). Mecanismos de nefrotoxicidad por plomo y cadmio. *Cartas de toxicología*, 46 (1-3), 153-162.

Guerra-Tamayo, J. L., Hernández-Cadena, L., Téllez-Rojo, M. M., Mercado-García, A. D. S., Solano-González, M., Hernández-Avila, M., & Hu, H. (2003). Exposición al plomo y su relación con el tiempo requerido para embarazo. *salud pública de méxico*, 45, 189-195.

Hernández-Vásquez, A., Azañedo, D., Antiporta, D. A., & Cortés, S. (2017). Análisis espacial de la anemia gestacional en el Perú, 2015. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34, 43-51.

Jansson, T. y Powell, TL (2006). Transporte placentario humano en crecimiento fetal alterado: ¿funciona la placenta como un sensor de nutrientes? - una revisión. *Placenta*, 27, 91-97.

Kalia, K. y Flora, SJ (2005). Estrategias para medidas terapéuticas seguras y efectivas para el envenenamiento crónico por arsénico y plomo. *Revista de salud ocupacional*, 47 (1), 1-21.

Kumar, V. (2018). *Robbins patología humana*. A. K. Abbas, & J. C. Aster (Eds.). Elsevier.

Lamichhane, N., Udayakumar, TS, D'Souza, WD, Simone, II, Charles, B., Raghavan, SR, ... & Mahmood, J. (2018). Liposomas: aplicaciones clínicas y potencial para la administración de fármacos guiados por imágenes. *Moléculas*, 23 (2), 288.

- LONDOÑO-FRANCO, L. F., LONDOÑO-MUÑOZ, P. T., & MUÑOZ-GARCÍA, F. G. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145-153.
- López-Carrillo, L., Torres-Sánchez, L., López-Cervantes, M., & Rueda-Neria, C. (2001). Identificación de lesiones mamarias malignas en México. *salud pública de méxico*, 43(3), 199-202.
- Mendoza, L., Pérez, B., & Bernal, S. S. (2010). Estado nutricional de embarazadas en el último mes de gestación y su asociación con las medidas antropométricas de sus recién nacidos. *Pediatría (Asunción): Organo Oficial de la Sociedad Paraguaya de Pediatría*, 37(2), 91-96.
- Monteiro, CE, Cesário, R., O'Driscoll, NJ, Nogueira, M., Válega, M., Caetano, M., y Canário, J. (2016). Variación estacional de metilmercurio en núcleos de sedimentos del estuario del Tajo (Portugal). *Boletín de contaminación marina*, 104 (1-2), 162-170.
- Mozaffarian, D., Benjamin, EJ, Go, AS, Arnett, DK, Blaha, MJ, Cushman, M., ... & Huffman, MD (2015). Resumen ejecutivo: estadísticas de enfermedad cardíaca y accidente cerebrovascular: actualización de 2015: un informe de la American Heart Association. *circulación*, 131 (4), 434-441.
- Navarrete-Espinosa, J., Sanin-Aguirre, L. H., Escandon-Romero, C., Benitez-Martinez, G., Olaiz-Fernandez, G., & Hernandez-Avila, M. (2000). Lead blood levels in mothers and newborn infants covered by the Mexican Institute of Social Security. *Salud pública de Mexico*, 42(5), 391-396.
- Organización Mundial de la Salud. (2009) *Mujeres y salud: evidencia de hoy en la agenda de mañana*. Organización Mundial de la Salud.
- Patiño, SRG, Tolentino-mayo, L., Monterrubio, EAF, Harris, JL, Vandevijvere, S., Rivera, JA y Barquera, S. (2016). Calidad nutricional de los alimentos y bebidas no alcohólicas anunciadas en la televisión mexicana según tres modelos de perfil de nutrientes. *BMC Public Health*, 16 (1), 733.
- Patra, RC, Rautray, AK y Swarup, D. (2011). Estrés oxidativo en la toxicidad del plomo y el cadmio y su mejora. *Veterinaria internacional*, 2011.
- Poma, P. A. (2008, June). Intoxicación por plomo en humanos. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 69, No. 2, pp. 120-126). UNMSM. Facultad de Medicina.
- Purizaca-Benites, M. (2008). La placenta y la barrera placentaria. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 54(4), 270-278.
- Ramos-Arroyo, Y. R., & Siebe-Grabach, C. D. (2006). Estrategia para identificar jales con potencial de riesgo ambiental en un distrito minero: estudio de caso en el Distrito de Guanajuato, México. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 23(1), 54-74.
- Ramos-Arroyo, Y. R., & Siebe-Grabach, C. D. (2006). Estrategia para identificar jales con potencial de riesgo ambiental en un distrito minero: estudio de caso en el Distrito de Guanajuato, México. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 23(1), 54-74.
- Regoeczi, E. (2019). *Iodine labeled plasma proteins*. CRC Press.
- Rossary, A., Farges, MC, Lamas, B., Miles, EA, Noakes, PS, Kremmyda, LS, ... & Calder, PC (2014). El aumento del consumo de salmón durante el embarazo previene en parte la disminución de algunas

concentraciones plasmáticas de aminoácidos esenciales en mujeres embarazadas. *Nutrición clínica*, 33 (2), 267-273.

Rurik, I., Móczár, C., Buono, N., Frese, T., Kolesnyk, P., Mahlmeister, J.,...&Jancsó, Z. (2017). Aumento de peso temprano y menopáusico y su relación con el desarrollo de diabetes e hipertensión. *Endocrinología y diabetes experimental y clínica*, 125 (04), 241-250.

Stark, AH, Crawford, MA y Reifen, R. (2008). Actualización sobre el ácido alfa-linolénico. *Revisiones de nutrición*, 66 (6), 326-332.

Téllez-Rojo, M. M., Bautista-Arredondo, L. F., Richardson, V., Estrada-Sánchez, D., Ávila-Jiménez, L., Ríos, C., ... & Romero-Ramírez, A. (2017). Intoxicación por plomo y nivel de marginación en recién nacidos de Morelos, México. *salud pública de méxico*, 59, 218-226.

Wide, L. y Wide, M. (1979). Gonadotropina coriónica en el ratón desde la implantación hasta el término. *Reproducción*, 57 (1), 5-9.

