



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DURANTE LA
NEURULACIÓN DE LA RATA POR EFECTO DE LA INGESTIÓN DE
ACETATO DE PLOMO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALEJANDRA OCHOA TRUJILLO

DIRIGIDA POR:

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2002

No. H67212
NB: T100
Clas. 619.93
0169

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

A

VELOCIDAD DE LA LUZ EN EL VACÍO
Y EN LOS MEDIOS MATERIALES
A

1978

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

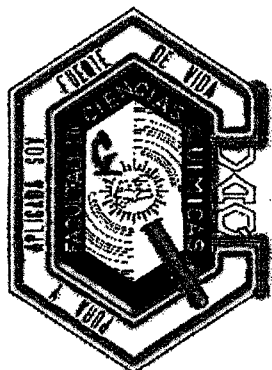
LIBRO

DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

LIBRO

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

LIBRO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DURANTE LA
NEURULACIÓN DE LA RATA POR EFECTO DE LA INGESTIÓN DE
ACETATO DE PLOMO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ALEJANDRA OCHOA TRUJILLO

DIRIGIDA POR:

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES:

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

DIRECTOR

M. en C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES

PROPIETARIO

Q.B. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ

PROPIETARIO

Q.B. SUSANA FLORES ROBLES

SUPLENTE

AGRADECIMIENTOS

ESTE TRABAJO LO DEDICO A...

Dios que es mi mayor fuerza en la vida.

Mis **padres** por brindarme su apoyo incondicional, gracias a ustedes he llegado hasta aquí y espero seguir llenándolos de satisfacción y orgullo.

Mi **hermana** por su confianza y apoyo en cada momento, te dedico este trabajo como símbolo del gran cariño que te tengo.

Mis **amigos** como un compromiso de una amistad auténtica.

LES DOY LAS GRACIAS A...

Dra. María Guadalupe García Alcocer por todo su apoyo y confianza, así como también por hacerme partícipe de sus conocimientos.

M. en C. Gustavo Pedraza Aboytes por su empeño en formarme como profesionalista y ser humano.

Q. B. Sergio Pacheco Hernández por brindarme su apoyo y compartir conmigo sus valuales conocimientos y experiencias.

Q.B. Susana Flores Robles por el tiempo que dedicó en la revisión de este trabajo.

Mis compañeras **Lorena Olvera, Gabriela Sarabia** y a mi amiga **Liliana Camacho** por su colaboración en la realización de este trabajo.

M.V.Z. José Martín García Sevin del Instituto de Neurobiología, UNAM campus Juriquilla, por su apoyo en los animales de experimentación.

Marisol, Liliana, Norma, Lorena y Karla por brindarme su apoyo y amistad durante esta larga jornada.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
Índice general	i
Índice de cuadros	ii
Índice de figuras	iii
Resumen	
Introducción	1
Planteamiento del problema	23
Hipótesis	23
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
Metodología	24
Resultados	28
Discusión	40
Conclusiones	48
Bibliografía	49

ÍNDICE DE CUADROS

	PÁGINA
Cuadro 1. Fuentes contaminantes del plomo	5
2. Toxicología del plomo	6
3.A. Dosis de plomo administradas a mamíferos	18
3.B. Dosis de plomo administradas a mamíferos	19
4. Parámetros morfológicos de embriones de rata	26

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Control de la expresión de genes en eucariotas	7
2. Inicio de la transcripción de un gen eucariota por la RNA polimerasa	9
3. Modelo de activación genética a distancia en eucariotas	10
4. Secuencia reguladora de un típico gen eucariota	11
5. Fragmentación y formación del blastocisto	13
6. Neurulación	15
7. Defecto del tubo neural en humanos	16
8. Confirmación morfológica de la edad embrionaria	28
9. Grupo control	29
10. Grupo blanco	30
11. Grupo acetato de plomo 1.4g.	31
12. Grupo acetato de plomo 1.7g.	33
13. Grupo acetato de plomo 1.7g. en dosis repetidas	35
14. Distribución de las anormalidades	36
15. Estructura de un embrión normal	37
16. Estructura de un embrión anormal	38
17. Efecto del acetato de plomo en embriones de rata	39

RESUMEN.

El plomo tiene efectos adversos en la población general principalmente en niños pequeños y fetos. La exposición constante a bajos niveles de plomo, durante largos periodos puede causar dificultad de aprendizaje irreversible, retraso mental, y retraso en el desarrollo neurológico y físico.

El plomo metálico se absorbe con lentitud, pero en forma constante por inhalación y absorción gastrointestinal. En un principio se distribuye ampliamente a tejidos blandos como médula ósea, hígado, riñones y testículos. Su vida media en estos tejidos es aproximadamente de 30 días. La mayor parte del plomo que entra al organismo finalmente se fija al esqueleto; la vida media de eliminación a partir del hueso es mayor de 20 años. La capacidad de excreción del plomo es limitada y por ello, cualquier incremento en la ingestión diaria, por mínimo que sea, puede producir un "balance" positivo del metal, es decir su acumulación mayor.

Las mujeres en edad reproductiva con altos niveles de plomo en sangre están en riesgo de transmitir ese nivel al feto, ya que el plomo cruza la placenta durante la etapa de gestación.

En el presente estudio se exploró el efecto teratógeno del plomo durante el inicio de la formación del sistema nervioso. Se trabajó con ratas gestantes a las que se administró el plomo a los 8 días de gestación. Se formó el grupo control con 0.0g. de acetato de plomo; el grupo de acetato de potasio como blanco (1.7g). Las dosis de acetato de plomo fueron de 1.4, 1.7g y dosis repetidas de 1.7g. Las ratas se sometieron a operación cesárea extrayéndose los embriones.

Las anormalidades más frecuentemente encontradas fueron: aplasia generalizada con un 40% y flexión invertida con un 26% de aparición, estos datos comprenden el estudio de 273 embriones provenientes de 20 ratas gestantes. Con el estudio realizado se puede concluir que el plomo origina cambios fenotípicos durante la neurulación en la rata, además la exposición consecutiva a dosis de acetato de plomo incrementa significativamente la aparición de anormalidades en el embrión.

INTRODUCCIÓN.

1.1. ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR EFECTO DE PLOMO.

La exposición natural, al plomo ocurre en el hombre desde el momento de su concepción, ya que se ha demostrado que tanto el óvulo como el espermatozoide lo contienen y que la madre, a lo largo del embarazo, lo transmite al feto a través de la circulación placentaria. Así, al momento del nacimiento, la sangre del cordón umbilical de los recién nacidos normales contiene plomo en cantidades muy cercanas a las de sus madres (Montoya, 1997).

La población en general está expuesta a sufrir los efectos adversos del plomo, sin embargo, los grupos con mayor riesgo son los adultos expuestos laboralmente al metal y los niños menores de cinco años. El plomo es tóxico y no se le conoce función en el cuerpo humano. La exposición constante a largo plazo, de bajos niveles de plomo pueden causar dificultad de aprendizaje irreversible, retraso mental, y retraso en el desarrollo neurológico y físico (Schnaas y col., 1999). La intoxicación por plomo es una amenaza a la salud pública. Síntomas tempranos de intoxicación pueden incluir bajo apetito, fatiga, irritabilidad, anemia y dolor abdominal. Por los síntomas naturales en ésta etapa, la intoxicación por plomo a menudo, no se sospecha (Montoya, 1997; Gardella, 2001).

El plomo metálico se absorbe con lentitud, pero en forma constante por inhalación y absorción gastrointestinal. La absorción del polvo de plomo por vías respiratorias es la etiología más común de envenenamiento industrial. La absorción por vía digestiva varía de acuerdo con la naturaleza del compuesto plomado. Calcio, hierro y fósforo en la dieta, pueden alterar la absorción gastrointestinal de plomo. Una dieta baja en calcio y hierro incrementa la retención de plomo y hay manifestaciones tanto bioquímicas como morfológicas de un aumento de la toxicidad del plomo.

Los adultos absorben en promedio 10% del plomo que ingieren, en tanto que en los niños la cifra puede llegar a 40%. Por inhalación, el grado de absorción varía según la forma en que el plomo esté presente (vapores o partículas), y también con su concentración. Se absorben alrededor de 90% de las partículas de plomo inhaladas del aire. La concentración sanguínea tóxica en el ser humano de plomo es de 1.3 mg/L, mientras que la concentración sanguínea letal en mg/L es de 100 (Clark, 1990).

Una vez absorbido por vías respiratorias o digestivas, el plomo se une a los eritrocitos y en un principio se distribuye ampliamente a tejidos blandos como médula ósea, hígado, riñones y testículos. Su vida media en estos tejidos es aproximadamente de 30 días. La mayor parte del plomo que entra al organismo finalmente se fija al esqueleto, pelo y uñas (Lauwerys, 1992). La vida media de eliminación a partir del hueso es mayor de 20 años. El reservorio óseo puede proporcionar una fuente de plomo, si hay degradación ósea.

En animales de experimentación el plomo se excreta en la bilis, y en heces se elimina una cantidad mucho mayor que en la orina. La vida media de eliminación del plomo de la sangre es de uno a dos meses, y en cerca de seis meses se logra un estado de "equilibrio dinámico". Una vez que se alcanza este estado en el ser humano, la ingestión diaria de plomo es semejante a la excreción del material, y las concentraciones en los tejidos blandos son relativamente constantes. La capacidad de excreción del plomo es limitada y por ello, cualquier incremento en la ingestión diaria, por mínimo que sea, puede producir una acumulación mayor. La ingestión diaria promedio de plomo es de 0.2mg, en tanto que su acumulación comienza con la ingestión diaria de 0.6mg., cantidad que por lo común no producirá intoxicación manifiesta durante la vida del sujeto.

El plomo es capaz de formar complejos con muchos compuestos. Interfiere con la actividad de las enzimas y afecta a varios sistemas orgánicos. El sistema orgánico más sensible al plomo es el hematopoyético. Es común la anemia microcítica

hipocrómica, pero no todos los pacientes con intoxicación con plomo son anémicos. Este elemento induce grandes trastornos en la biosíntesis del grupo hem, provocando la excreción de porfirinas y sus precursores en la orina. Las enzimas más sensibles a la inhibición por plomo son la deshidratasa del ácido delta aminolevulínico y la ferroquelatasa. La inhibición de la primera enzima bloquea la transformación del ácido delta aminolevulínico a porfobilinógeno. El ácido delta aminolevulínico es excretado en la orina y su concentración urinaria puede utilizarse como prueba diagnóstica. La inhibición de la ferroquelatasa provoca una disminución en la producción del grupo hem y la acumulación de su precursor, la protoporfirina IX.

El plomo también afecta a los sistemas nervioso central y periférico. Todavía no se conoce con certeza la concentración mínima de plomo que puede provocar daño neurológico. Aun a concentraciones sanguíneas bastante elevadas y notables alteraciones de la función hematopoyética, algunos individuos no tienen manifestaciones neurológicas. El síntoma más común de neuropatía periférica es la debilidad indolora de músculos extensores de las manos. Las extremidades inferiores suelen ser menos afectadas. Por lo general, no ataca a la función sensorial. Casi siempre, la neuropatía inducida por plomo se desarrolla meses después de la exposición prolongada al elemento, pero puede presentarse en forma subaguda en dos a tres semanas. La mayor parte de las veces, la encefalopatía comienza con convulsiones y se acompaña de hipertensión intracraneal y edema cerebral. Otros signos incipientes pueden ser torpeza, vértigo, ataxia, caídas, cefalalgia, insomnio, inquietud e irritabilidad. También hay a veces perturbaciones de la vista (Goodman, 1996; Clark, 1990; Katzung, 1991).

El plomo daña a las neuronas, provocando alteraciones bioquímicas de las que resulta un déficit en el metabolismo energético, aún no se conoce con certeza dicho mecanismo. A nivel del sistema nervioso periférico, en casos de exposición prolongada, el plomo ocasiona desmielinización segmentaria y degeneración

axonal. Además, puede interactuar con el calcio en la placa neuromotora interfiriendo así en la transmisión del impulso (Montoya, 1997).

La exposición al plomo ocasiona un deterioro psíquico definido y progresivo en niños. Sus antecedentes indican evolución normal durante los primeros 12 a 18 meses de vida, seguido de una pérdida implacable y constante de sus capacidades motoras y del habla. Pueden mostrar hipercinesia intensa y conducta agresiva, y un cuadro convulsivo de difícil control (Muñoz y col., 1993).

La falta de percepción sensorial impide gravemente el aprendizaje. Las concentraciones de plomo rebasan los 60 $\mu\text{g/dL}$. en sangre entera. En niños con menores concentraciones de plomo en sangre, se ha observado una mayor frecuencia de conducta hiperkinética y una disminución pequeña, pero estadísticamente significativa, en el cociente intelectual.

El plomo puede causar lesión renal intersticial e hipertensión. En forma aguda, tal vez afecte el metabolismo del ácido úrico y asociarse a la etiología tanto en gota aguda como nefropatía gotosa. La intoxicación con plomo provoca también pérdida del apetito, malestar epigástrico, dolores abdominales de tipo cólico y estreñimiento (Montoya, 1997; Goodman, 1996; Katzung, 1991).

Se ha encontrado que la intoxicación con plomo se acompaña de una disminución en la fertilidad en mujeres y gran frecuencia de partos con producto muerto. En los hombres, se ha observado esterilidad y atrofia testicular en casos graves (Schnaas y col., 1996).

Cuadro 1. Fuentes contaminantes del plomo. Existen diversas fuentes del plomo que contaminan el ambiente y a partir de las cuales se puede producir la intoxicación.

FUENTES DE CONTAMINACIÓN DEL PLOMO
Producción minera, fundición y refinamiento.
Manufactura de acumuladores.
Industria química, en recipientes para ácidos fuertes o de evaporación.
Fabricación de pinturas, barnices y pigmentos como el sulfato, cromato, etc.
Manufactura de algunos insecticidas (los arseniatos de plomo se emplean en grandes cantidades como insecticidas para la protección de los cultivos) y ciertos plásticos.
Elaboración de cristales duros, esmaltes vítreos y cristales finos.
Como "antidetonante" de las gasolinas (Las gasolinas con plomo, contienen un aditivo llamado tetraetilo de plomo, que se usa para incrementar el índice de octano).
Elaboración de compuestos de plomo: inorgánicos (óxidos) y orgánicos (tetraetilo)

(Montoya, 1997; Jiménez y col., 1993).

Cuadro 2. Toxicología del plomo. Existen dos principales formas de entrada del plomo al organismo, las cuales tienen diferentes vías de absorción, se distribuyen en diversas partes del organismo y así llegan a los órganos blancos, donde son metabolizados y eliminados posteriormente.

Forma de entrada al organismo	Vía de absorción	Distribución	Órganos blanco para la toxicidad	Metabolismo	Eliminación
Óxidos y sales de plomo inorgánico	Gastrointestinal, respiratoria, cutánea (menor)	Hueso (90%), dientes, cabello, sangre, hígado, riñón	Tejidos hematopoyéticos e hígado, SNC, riñón, unión neuromuscular	Disociación y fijación del plomo a grupos sulfhidrilo importantes en tejidos	Orina y heces (principal); sudor (menor)
Orgánico (tetraetil plomo)	Cutánea (principal) gastrointestinal	Hígado	SNC	Desalquilación hepática (rápida); trialkylmetabolitos (lenta) disociación del plomo.	Orina y heces (principal); sudor (menor)

(Katzung, 1991)

EXPRESIÓN GENÉTICA

El plomo puede alterar la expresión genética que consiste en la transcripción del DNA a RNA y traducción del RNA a proteína. Las funciones del DNA y del RNA se basan en dos principios generales: la complementariedad entre las bases de cadenas sencillas y la unión de proteínas diversas al DNA y RNA. La mayoría de los genes determinan proteínas, y sus transcritos son mRNA o pre-mRNA; sin embargo, una minoría determinan RNA funcionales tales como los tRNA y rRNA, y estos RNA no se traducen nunca. El RNA es una molécula de cadena sencilla cuya secuencia es complementaria a la cadena de DNA a partir de la cual se transcribe.



Figura 1. Control de la expresión de genes en eucariotas. En el núcleo la expresión de genes puede ser controlada principalmente por procesos transcripcionales o post-transcripcionales (Alberts y col., 1998).

Una célula puede controlar las proteínas, controlando cuándo y cómo un gen dado es transcrito; controlando cómo el RNA primario transcrito es procesado o seleccionando cuáles RNAs mensajeros son trasladados por los ribosomas o activando o inactivando proteínas después de que han sido hechas.

La secuencia a la que se une la polimerasa de RNA para iniciar la transcripción se denomina promotor. El promotor forma parte de la región reguladora adyacente a la región informativa de un gen, dicha región atrae a la enzima RNA polimerasa y la orienta para comenzar su tarea de hacer una copia de RNA del gen. Existen sitios específicos para que la RNA polimerasa se una al promotor, esta unión puede ser regulada por diferentes compuestos.

La expresión o no expresión del gen depende de una variedad de factores, incluyendo el tipo de célula sus circunstancias, edad, y señales extracelulares. Las secuencias reguladoras de DNA no trabajan por ellas mismas. Para tener efecto estas secuencias deben ser reconocidas por proteínas reguladoras de genes que se unen al DNA. Esta combinación actúa como un interruptor para el control de la transcripción. Se han identificado cientos de secuencias reguladoras de DNA y cada una es reconocida por una o más proteínas reguladoras de genes. Las proteínas que reconocen una secuencia de DNA lo hacen porque la superficie de la proteína encaja exactamente con una característica especial de la superficie de la doble hélice en esa región.

Existen varios complejos de factores de transcripción diferentes que interaccionan con la RNA II polimerasa. Estos complejos se conocen como factores de transcripción general (TFII), porque constituyen el requerimiento mínimo para que la RNA II polimerasa inicie la transcripción en un promotor.

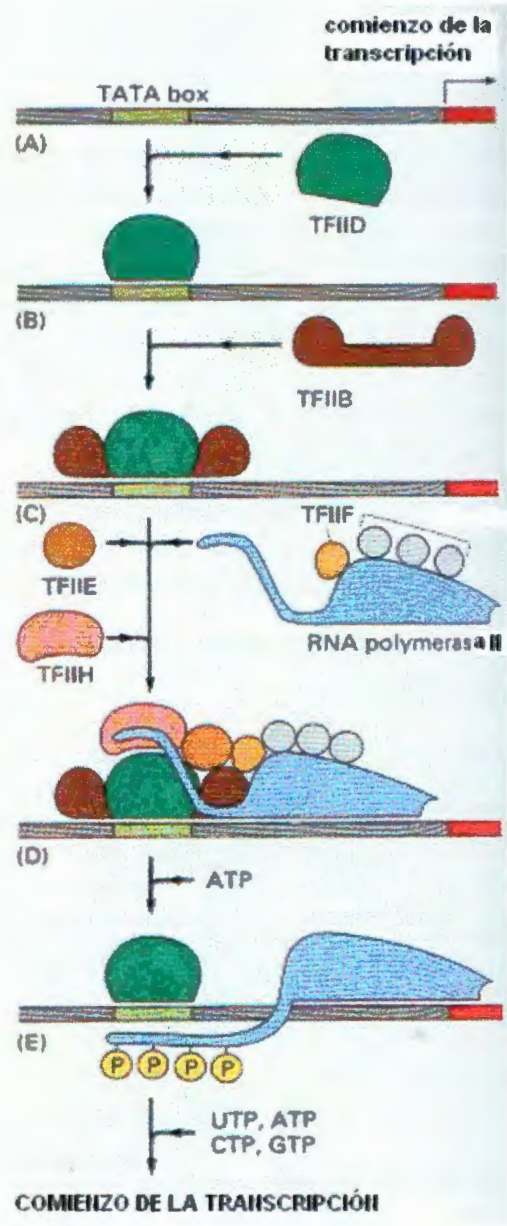


Figura 2. Inicio de la transcripción de un gen eucariota por la RNA polimerasa. A) El promotor contiene una secuencia de DNA llamada TATA box, B) La TATA box, es reconocido y ligado por el factor de transcripción TFIID, el cual facilita la unión de TFIIB, C) TFIID causa una distorsión local en el DNA, D) El resto de los factores de transcripción general, así como la RNA polimerasa se unen con el promotor, E) TFIIN usa ATP para fosforilar a la RNA II polimerasa cambiando su conformación, entonces ésta es liberada del complejo y comienza la transcripción (Alberts y col., 1998).

Los factores de transcripción general y la RNA polimerasa no se ensamblan eficientemente al promotor por ellos mismos y una proteína reguladora de genes unida al sitio de unión para la proteína activadora es necesario para estimular el proceso de ensamble. El DNA actúa como una traba, causando que una proteína unida al sitio de enlace para el activador interactúe con el complejo de proteínas unidas al promotor.

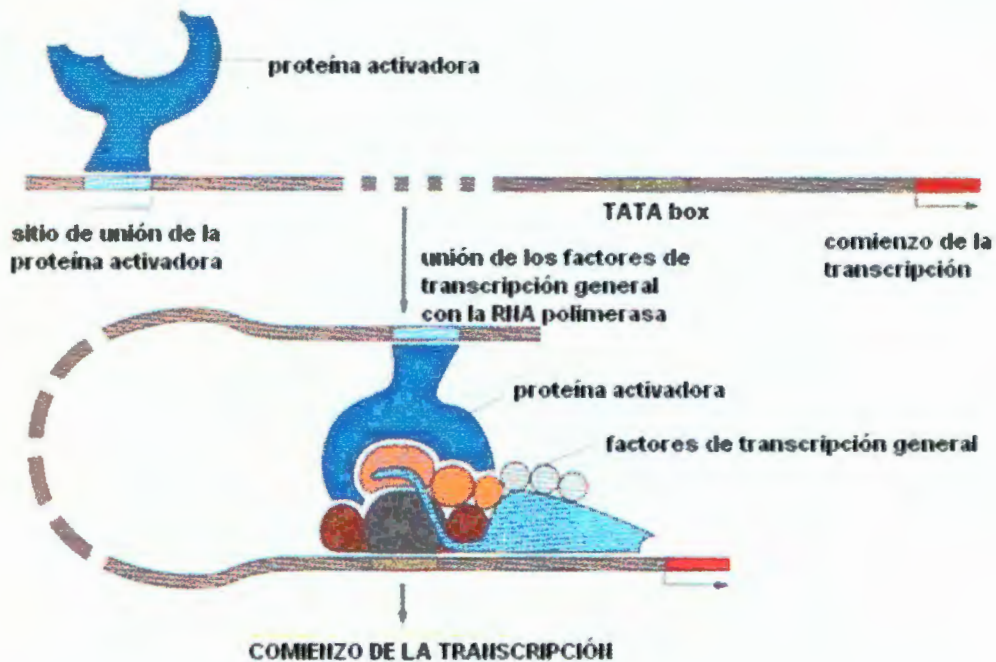


Figura 3. Modelo de activación genética a distancia en eucariotas. En eucariotas, las proteínas reguladoras de genes unidas a secuencias reguladoras de genes distantes, pueden aumentar o disminuir la actividad de la RNA polimerasa unida al promotor. Una de las vías por las que ellas hacen esto es por la influencia del ensamble del complejo de iniciación de la transcripción. Los activadores facilitan el ensamblaje del complejo mientras que los represores sabotarán el correcto ensamblaje de éste.

Muchas proteínas reguladoras de genes eucariotas trabajan como parte de un comité de proteínas reguladoras, todas las cuáles son necesarias para expresar el gen en la célula correcta, en respuesta a condiciones correctas, en el tiempo y al nivel requerido. Muchas proteínas se unen a secuencias reguladoras para

influenciar si la transcripción es iniciada. Los genes eucariotas tienen regiones controladas que contienen numerosos sitios tanto para proteínas reguladoras de acción positiva como de acción negativa.

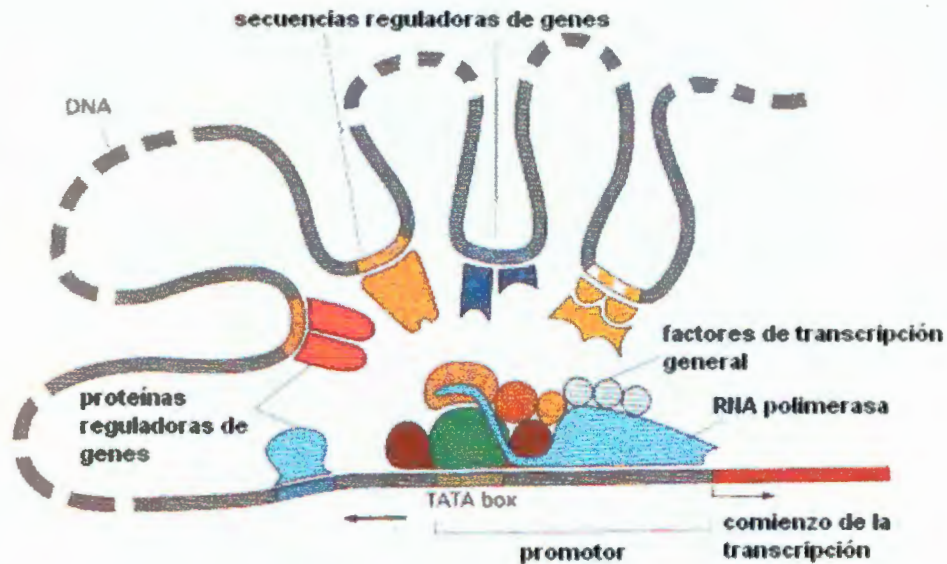


Figura 4. Secuencia reguladora de un típico gen eucariota. TATA box sirve como el punto de partida para el ensamblaje de factores de transcripción general. El punto en el cual la RNA polimerasa comienza la transcripción es típicamente localizado 25 pares de nucleótidos río abajo del TATA box. Las secuencias reguladoras de genes sirven como sitios de unión para proteínas reguladoras de genes. Las vueltas de DNA permiten que las proteínas reguladoras del gen unidas a sitios distantes del promotor interaccionen con las proteínas que ensamblan el promotor. Las proteínas reguladoras de genes y la localización de sus sitios de unión relativos a los promotores son diferentes para distintos genes.

La célula eucariota usa un comité de proteínas reguladoras para controlar cada uno de sus genes, por lo tanto puede rápidamente encender o apagar todos los grupos de genes, pues ese control directo de expresión de genes es combinacional. El efecto de una sola proteína reguladora de genes puede aún ser decisiva en la activación o desactivación de un gen particular simplemente para completar la combinación necesita activar o desactivar ese gen. La misma proteína puede completar la combinación de diferentes genes. Si un número de genes diferentes

contienen el mismo sitio regulado por la misma proteína, ésta puede ser usada para regular la expresión de todos ellos (Alberts y col., 1998; Griffiths y col., 2000).

1.2. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO.

La expresión genética es importante para el desarrollo del sistema nervioso que inicia con la fecundación, la cual ocurre en la porción intermedia dilatada de las trompas, llamada ámpula y consiste en la unión de un espermatozoide con un óvulo.

La división mitótica del cigoto en dos células hijas llamadas blastómeros comienza poco después de la fecundación. Alrededor del tercer día se ha formado una bola sólida de 16 blastómeros aproximadamente, a la cual se le llama mórula. A medida que aumenta el líquido en el interior de la mórula proveniente de la cavidad uterina, separa a las células en dos partes:

1. Una masa externa de células llamada trofoblasto, el cual forma más tarde la mayor parte de la placenta.
2. Un grupo de células de la localización central conocidas como masa celular interna (embrioblasto) que se diferenciarán subsecuentemente para formar el embrión.

En la tercera semana se desarrollan tres capas germinativas y se forman tres estructuras importantes: la línea primitiva, la notocorda y el tubo neural. Al principio de la tercera semana aparece en sentido caudal, en la línea media de la superficie dorsal del disco embrionario, una banda lineal engrosada de ectodermo embrionario, conocida como banda primitiva. Conforme se alarga la banda primitiva por añadidura de células en su extremo distal, su extremidad craneal se engrosa para formar un nudo primitivo.

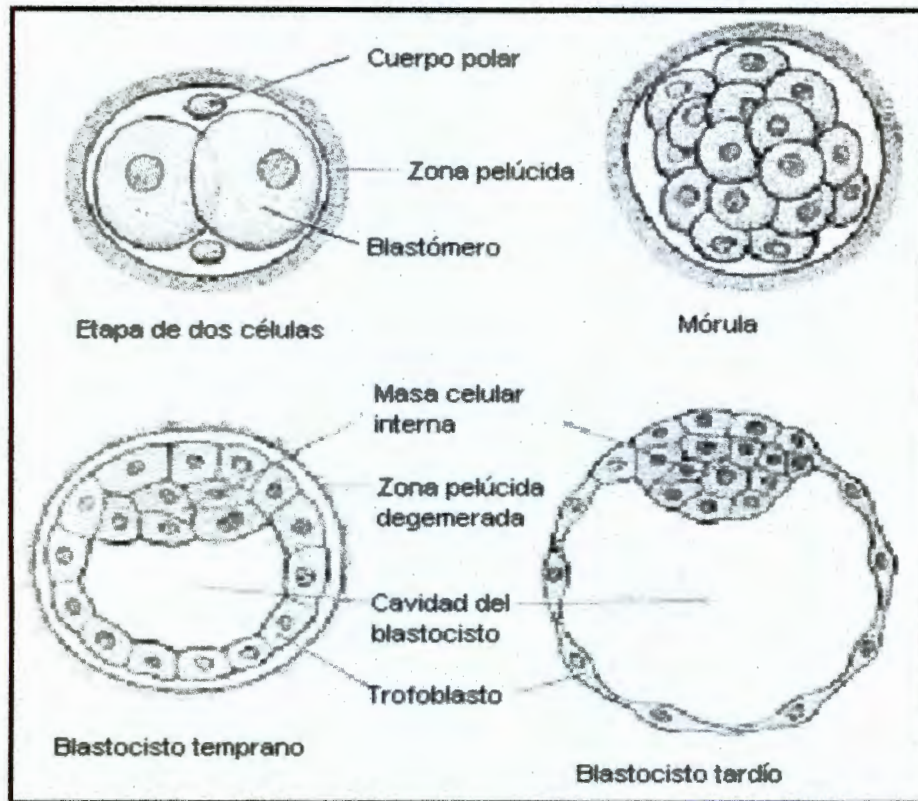


Figura 5. Fragmentación y formación del blastocisto. El cigoto se divide por mitosis en dos células hijas llamadas blastómeros, posteriormente se forma la mórula, que después de algunos días se separa en trofoblasto y masa celular interna o embrioblasto.

Las células que permanecen en el epiblasto forman la capa llamada ectodermo embrionario. Las células que emigran en sentido craneal a partir del nudo primitivo forman un cordón en la línea media conocido como proceso notocordal. Este cordón crece entre el ectodermo y el endodermo hasta que llega a la lámina procordal, la cual indica el sitio futuro de la boca. La notocorda define al eje primitivo del embrión. Induce al ectodermo que se apoya sobre ella para formar la lámina neural, a partir de la cual se originan tres capas germinativas (ectodermo, mesodermo y endodermo embrionarios), formadas durante la tercera semana, a partir de estas capas se originarán todos los tejidos y órganos del embrión. El ectodermo, por ejemplo, da origen al sistema nervioso central, al sistema nervioso

periférico, al epitelio sensorial del ojo, del oído y de la nariz, a las glándulas mamarias, a la hipófisis. Las células de la cresta neural, derivadas del ectodermo, dan lugar a las células de los ganglios craneales, espinales y autónomos, así como a las vainas celulares del sistema nervioso periférico.

La formación de la lámina neural y de los pliegues neurales, así como su cierre para formar el tubo neural se conoce como neurulación. Conforme se desarrolla la notocorda, el ectodermo embrionario que está sobre ella y el mesodermo adyacente se engrosan para formar la lámina neural (Jacobson, 1991). La lámina neural aparece primero en sentido craneal al nudo primitivo, después, la lámina neural se ensancha y por último se extiende en sentido craneal hasta la membrana bucofaríngea. Hacia el día decimoctavo, la lámina neural se invagina a lo largo de su eje central para formar el surco neural. Los pliegues neurales empiezan a acercarse, se fusionan, y convierten la lámina neural en tubo neural. Conforme el tubo neural se separa del ectodermo, las células de la cresta neural emigran en dirección interna e invaden el mesoblasto de cada lado del tubo neural, pronto forman una masa irregular y achatada, llamada cresta neural.

El extremo craneal del tubo neural forma el encéfalo, constituido por el cerebro anterior, medio y posterior. El cerebro anterior origina los hemisferios cerebrales y el diencefalo; el cerebro medio se convierte en el mesencefalo del adulto; y el cerebro caudal da origen a protuberancia anular, cerebelo y bulbo raquídeo. El resto y la parte más grande del tubo neural se convierte en médula espinal. La luz del tubo neural se convierte en ventrículos cerebrales y conducto central de médula espinal.

Las neuronas aferentes de los ganglios espinales y de los nervios craneales se desarrollan a partir de las células de la cresta neural. Las células de la cresta neural se diferencian también en neuronas multipolares de los ganglios autónomos, incluyendo los ganglios de los troncos simpáticos a lo largo de los lados de los cuerpos vertebrales; los ganglios colaterales o prevertebrales en los plexos de

tórax, abdomen y ganglios parasimpáticos terminales de las vísceras o cercanos a las mismas.

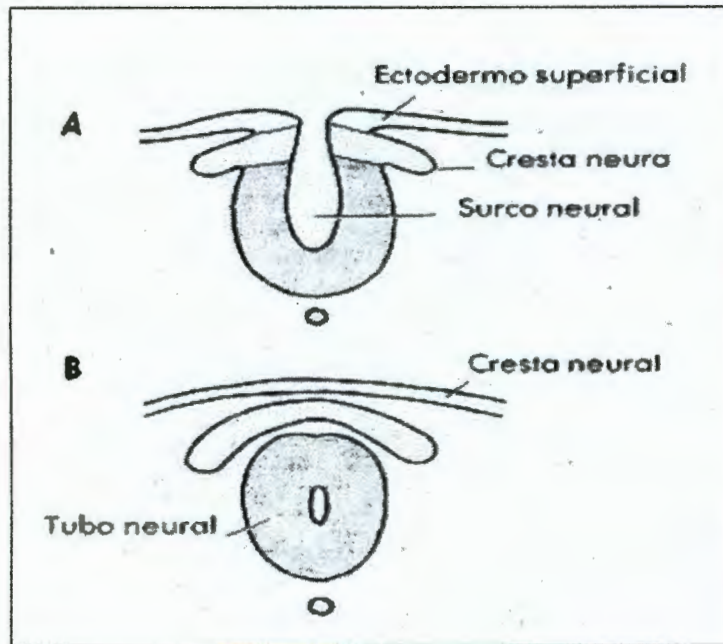


Figura 6. Neurulación. A) La lámina neural da origen al surco neural, ya que se invagina a lo largo de su eje central. De esta manera los pliegues neurales se fusionan y forman el tubo neural. B) Las células de la cresta neural emigran hacia el mesoblasto de cada lado del tubo neural, forman una masa achatada, llamada cresta neural (Adaptado de Moore, 1985).

Hacia el fin de la tercera semana, conforme se forman la notocorda y el tubo neural, el mesodermo comienza a dividirse en cuerpos cuboideos pareados, llamados somitos. El primer par de somitos se desarrolla a distancia corta en sentido caudal hacia el extremo caudal de la notocorda, y se forman pares subsecuentes en sucesión craneocaudal. Se forman unos 38 pares de somitos durante el llamado periodo somítico y llegan hasta de 42 a 44 pares. Durante el periodo somítico se utilizan para determinar la edad del embrión y originan la mayor parte del esqueleto axial, así como la musculatura relacionada con el mismo y gran parte de la dermis (Moore, 1985).

1.3. DEFECTOS DEL TUBO NEURAL.

Casi todas las anomalías congénitas de la médula espinal se deben a defectos del cierre del tubo neural durante la cuarta semana del desarrollo en humanos (Laurence, 1993). Estos defectos del tubo neural (DNT) afectan el tejido que recubre la médula espinal: meninges, arcos vertebrales, músculos y piel. El origen de la mayoría de los defectos del tubo neural es multifactorial y la posibilidad de dar a luz un hijo afectado aumenta considerablemente cuando ya se ha tenido un niño con este defecto. Dentro de las causas de los defectos del tubo neural se tienen las siguientes: factores nutricionales (hipervitaminosis); factores ambientales; fármacos como el ácido valproico; hipertemia; hipotermia, etc. (Moore, 1999).

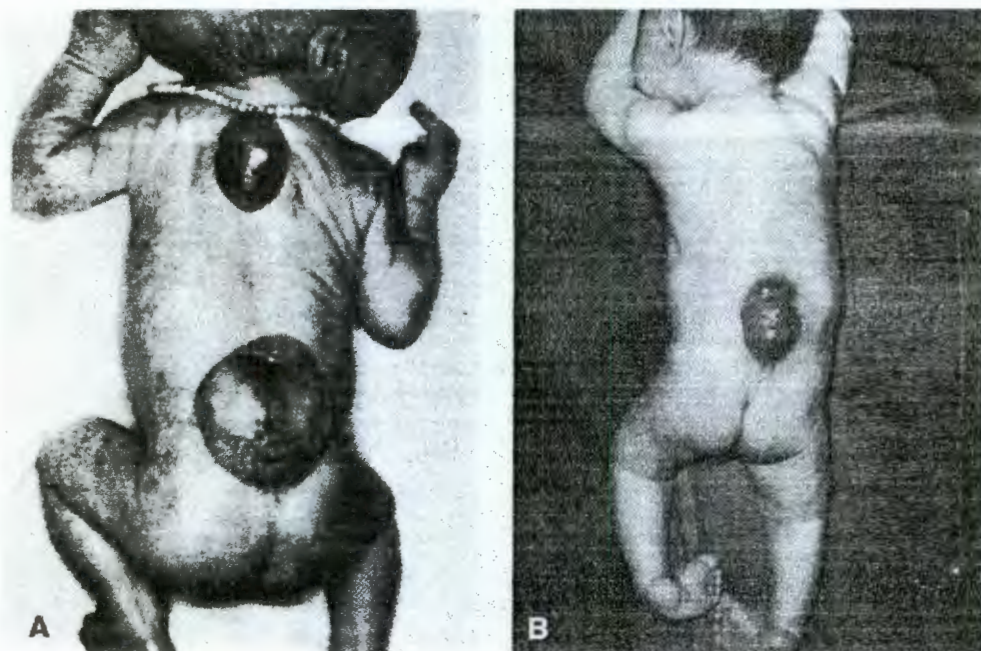


Figura 7. Defecto del tubo neural en humanos. A, espina bifídica con meningocele en las regiones torácica y lumbar. B, espina bifídica con mielosquisis en la región lumbar. Obsérvese que la inclusión de los nervios afectó los miembros inferiores (Moore, 1999; Laurence, 1974).

1.4. RELACIÓN ENTRE NIVELES DE PLOMO Y DEFECTOS DEL TUBO NEURAL.

En 1991, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) recomendó un marco universal sobre niveles de plomo en sangre en niños desde los 6 meses a los 2 años de edad. Los niveles mayores de 10µg/dL son considerados como anormales. Por lo tanto se está en riesgo si el nivel de plomo en sangre es mayor de 10µg/dL. Las mujeres en edad reproductiva con altos niveles de plomo en sangre están en riesgo de transmitir ese nivel al feto, ya que el plomo cruza la placenta durante la etapa de gestación (Centers for Disease Control, 1997).

En un estudio que comparaba los niveles de plomo en la sangre materna, la sangre del cordón umbilical y el líquido amniótico en 19 mujeres que dieron a luz, la concentración de plomo en sangre encontrada fue mayor en el líquido amniótico que en el cordón umbilical. Estos datos sugieren que las membranas fetales, las cuales muestran altas concentraciones de plomo, pueden participar en la eliminación de este metal tóxico por absorción desde el líquido amniótico. La correlación entre los niveles de plomo en sangre de la madre y el cordón umbilical está en el rango de 0.55 a 0.92. Por esta razón, la exposición de la madre debe ser reducida para proteger al feto.

El programa de madre en riesgo en Canadá examinó las tres formas comunes de exposición ocupacional reportadas en mujeres embarazadas. Después de radiación y solventes orgánicos, la exposición al plomo fue la más común reportada (Gardella, 2001).

Cuadro 3.A. Dosis de plomo administradas a mamíferos. Se registran las dosis letales mínimas y dosis letal 50 para diferentes compuestos de plomo en distintos organismos.

Seres humanos:	DL_{mín} 1,70 µg/kg (estimado)(Pb tetraetilo)
-----------------------	--

Mamíferos:

Ratas:	DL _{mín} 17mg/kg, oral (Pb tetraetilo)
	CL ₅₀ 850 mg/m ³ , inhalación (60 min.)(Pb tetraetilo)
	DL _{mín} 31 mg/kg, intravenoso (Pb tetraetilo)
	DT _{mín} 11 mg/kg, oral, (6°-16o días de preñez) (Pb tetraetilo)
	DT _{mín} 7500 µg/kg, oral (4 o -14 o d de preñez) (Pb tetraetilo)
	DL ₅₀ 15 mg/kg, parenteral (Pb tetraetilo)
	DL ₅₀ 109 mg/kg, oral (Pb tetrametilo)
	DL _{mín} 73 mg/kg, intraperitoneal (Pb tetrametilo)
	DT _{mín} 80 mg/kg, oral (9° - 11° d de preñez)(Pb tetrametilo)
	DL ₅₀ 105 mg/kg, parenteral (Pb tetrametilo)
Ratones:	CL _{mín} 650 mg/m ³ , inhalación (7 horas)(Pb tetraetilo)
	DL _{mín} 86 mg/kg, subcutáneo (Pb tetraetilo)
	DT _{mín} 100 mg/kg, subcutáneo (21 d.) intermit. (Pb tetraetilo)
Conejos:	DL _{mín} 24 mg/kg, oral (Pb tetrametilo)
	DL _{mín} 3.391 mg/kg, dérmico (Pb tetrametilo)
	DL _{mín} 90 mg/kg, intravenoso (Pb tetrametilo)
	DL _{mín} 90 mg/kg, intravenoso (Pb tetrametilo)
	DL _{mín} 90 mg/kg, intravenoso (Pb tetrametilo)
Cobayas:	DL _{mín} 995 mg/kg, dérmico (Pb tetraetilo)

Cuadro 3.B. Dosis de plomo administradas a mamíferos. Se registran diferentes dosis de otras sales de plomo para diversos mamíferos.

Mamíferos

Ratas:	DL 11 000 mg/kg, oral (acetato de plomo)
	DL ₅₀ 100-825 mg/kg, oral (arseniato de plomo)
Conejos	DL ₅₀ 125 mg/kg, oral (arseniato de plomo)
Pollos	DL ₅₀ 450 mg/kg, oral (arseniato de plomo)
Perros	DL 2 000-3 000 mg/kg, oral (sulfato de plomo)

(DVGW, 1985; UBA, 1986)

En un estudio realizado a 615 mujeres un incremento del plomo en el hueso tubercular y el cortical (de la madre) fueron asociados con un incremento en el nivel de plomo en la sangre del cordón. Así mismo, un incremento en el plomo del aire fue asociado con un incremento en el nivel de plomo en la sangre del cordón y con un día de uso a la semana de cerámica vidriada para tomar alimento durante el periodo prenatal incrementó el nivel de plomo en sangre fetal. Indirectamente la exposición de las mujeres embarazadas puede ocurrir cuando el esposo lleva polvo de plomo a su casa en la ropa, piel o cabello. Además el padre que trabaja en la industria de plomo puede ser considerado como un riesgo indirecto para el feto (Chuang y col., 2001).

Crocetti y col., 1990 reportaron elevados niveles de plomo en mujeres blancas y negras en edad reproductiva. Se tuvieron dos grupos: el primero con mujeres de 15 a 19 años de edad, y el segundo con mujeres de 20 a 40 años. Los resultados fueron los siguientes: el 9.2% de mujeres blancas de 15 a 19 años de edad y el 9.7% de mujeres blancas de 20 a 40 años tenían niveles de plomo mayores a 10µg/dL. En mujeres negras el 8.2% en grupo de edades de 15 a 19 años y el 19.7% del grupo de 20 a 40 años tuvo niveles de plomo mayores a 10µg/dL. Aplicando estos porcentajes a áreas metropolitanas, millones de fetos podrían estar

en alto riesgo de exposición al plomo. El peso al nacer es uno de los parámetros más frecuentemente estudiados en el riesgo fetal. Aunque muchos estudios sugieren que la exposición baja de niveles de plomo afecta el tamaño del feto, la mayoría han revelado que no hay correlación (Greene y col., 1990).

Dietrich y col., 1987 reportaron una asociación significativa entre los niveles de plomo en la sangre de la madre con la gestación de 6 semanas y el peso al nacer (González y col., 1997). Aunque los cofactores fueron calculados por un análisis estadístico, la prevalencia de madres fumadoras o alcohólicas podría haber sido menospreciado.

En otro estudio con mujeres embarazadas, los niveles de plomo en sangre fueron seguidos desde el tercer mes de embarazo hasta que los niños tenían 2 años de edad. La condición general de parto, la historia familiar de la mujer embarazada, la alimentación y el desarrollo de los infantes fueron investigados, así como los niveles de plomo antes y después del nacimiento y sus efectos en el crecimiento de infantes fueron analizados. El resultado sugiere una significativa correlación de los niveles de plomo en sangre en la mujer embarazada cerca del nacimiento, y en el cordón umbilical con el crecimiento del infante. El análisis de la regresión múltiple mostró una negativa correlación entre el nivel de plomo en sangre en relación a la altura y peso del infante en el primer y segundo años de edad (Tao y col., 2001).

Bellinger y col., 1991 usaron la información de 4,000 recién nacidos para saber si la exposición de niveles de plomo en mujeres embarazadas está asociado con un disturbio en el crecimiento del feto en una zona urbana, socio-económicamente en desventaja. Después de controlar la edad gestacional y que las mujeres embarazadas no fumaran, reportaron que los infantes con niveles de plomo mayores a $15\mu\text{g/dL}$. tenían de 1.5 a 2.5 tiempos mayores de riesgo de estar en una edad gestacional pequeña, el crecimiento intrauterino restringido o bajo peso al nacer que los infantes con niveles de plomo menores de $5\mu\text{g/dL}$.

Aunque la exposición al plomo prenatal podría no afectar el crecimiento como un factor aislado, los efectos acumulativos de exposiciones de plomo prenatal y postnatal afecta el crecimiento extrauterino. Estos efectos parecen acumularse si persiste la exposición a altas concentraciones de plomo (Shukla y *col.*, 1989).

Ha sido reportado que el plomo tiene una acción neurotóxica principalmente en niños. Se realizó un estudio en ratas Long-Evans, las cuáles eran expuestas a acetato de plomo en agua para beber desde temprana edad de gestación (día 2-6) o desde los 28 días de edad. En la 13ª semana de edad, la actividad del sistema dopaminérgico NAC (núcleo *accumbens*) fue estudiado por medio de microdiálisis transversal. El tratamiento de acetato de plomo no modificó la concentración extracelular de dopamina (DA) ni de ácido 3,4-dihydroxyphenylacético (DOPAC), con respecto a las ratas control. Sin embargo, la depolarización neuronal, inducida por perfusión con 60mM KCL, incrementó los niveles extracelulares de DA significativamente menos en ratas expuestas a plomo durante la vida intrauterina, con respecto a ambas, control y ratas adultas tratadas. Las ratas tratadas en útero también respondieron con una menor liberación de DA con la administración de anfetamina (Devoto y *col.*, 2001).

Un estudio realizado en un grupo de madres embarazadas con baja exposición al plomo. Un total de 199 niños fueron tomados en cuenta en la Child Behavior Checklist (CBCL) en edades de 4, 4 ½ y 5 años. El promedio acumulado de plomo en sangre fue determinado de series de muestras tomadas dos veces al año desde el nacimiento. Los análisis se derivaron de 191 niños con datos disponibles. La concentración de plomo fue relacionada con pequeños incrementos en la delincuencia (Wasserman y *col.*, 2001).

Usando una rata modelo, Chole y Richter, 1973 sugirieron que las exposiciones al plomo alteran la síntesis de DNA in vivo. El plomo interfiere con la nutrición y el suplemento de energía por competición con otros cationes como el zinc, hierro y

calcio para limitar su suplemento en sitios críticos y para interferir con la función mitocondrial y la síntesis de citocromos.

Se ha sugerido que el plomo puede interferir con la mitosis, alteraciones cromosómicas, cambios de la membrana o disturbios en la nutrición y fuentes de energía. El plomo actúa en muchos de estos mecanismos. *In vitro*, puede afectar la síntesis de DNA, incrementado la incidencia de cromosomas dicéntricos y causa defectos en centralización durante la mitosis (Sirover y *col.*, 1976).

Varnagy y *col.*, 1999 proponen que los efectos teratogénicos del acetato de plomo en ratas sólo se presentan en combinación con un fungicida que contiene un 80% de mancozeb. Las dosis de acetato de plomo administradas fueron las siguientes: 0.1, 0.5, 1.0, 10 y 1000 mg/kg de peso. La dosis de pesticida fue de 750 mg/ kg de peso en todos los grupos tratados. El acetato de plomo no causó anomalías en el desarrollo en ratas. Las anomalías en el desarrollo observadas en embriones de animales tratados ocurrieron esporádicamente (ya que ocurrieron en el grupo control y en los grupos tratados). Los resultados no mostraron un efecto de dosis – respuesta, y el acetato de plomo no fue encontrado ser teratogénico en ratas en este trabajo. En la administración combinada de acetato de plomo y mancozeb se observó que el promedio de peso en las madres disminuyó durante el embarazo, la razón de vida de los fetos disminuyó después de las dosis más bajas y la mortalidad fetal incrementó en los grupos de dosis más bajas y en las más altas. La razón de la resorción fetal fue mayor en todos los grupos tratados que en el control. Con esto se concluyó que la administración de ambas sustancias juntas, acetato de plomo y un mancozeb puede causar toxicidad maternal, embriotoxicidad y efectos teratogénicos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

De acuerdo a los antecedentes mencionados:

- a) El plomo se absorbe con lentitud, pero en forma constante por inhalación y absorción gastrointestinal.
- b) Atraviesa la placenta.
- c) Compite con iones divalentes como calcio, zinc, entre otros.
- d) Una dieta baja en hierro y calcio incrementa la retención de plomo, y hay manifestaciones bioquímicas y morfológicas de un aumento de la toxicidad del plomo.
- e) Causa alteración en el sistema nervioso.
- f) Es teratógeno en combinación con pesticidas.

Se plantea la siguiente:

HIPÓTESIS.

La ingestión de acetato de plomo altera la expresión genética durante la neurulación.

OBJETIVO GENERAL.

Comprobar que la ingestión de acetato de plomo provoca alteraciones en la expresión genética durante la neurulación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Comprobar la edad gestacional de embriones de rata.
- 2) Determinar el tipo de anomalías que se presentan al ingerir tres diferentes concentraciones de acetato de plomo en rata gestante.
- 3) Comparar la frecuencia de aparición en cada tipo de anomalía que se encuentre y la significancia de los datos.

METODOLOGÍA.

Métodos biológicos.

Se utilizarán ratas Sprague Dawley nulíparas de 12 semanas de edad, mantenidas con agua y alimento ad libitum, con periodos de luz/obscuridad de 12 hrs. y una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Los animales se cruzaron a razón de dos hembras por macho durante 4hr. y un día después de la aparición del tapón vaginal se denominará día uno de la gestación.

Se tuvieron ratas control (0.0g.) y ratas con administración de acetato de potasio como blanco (1.7g). Las dosis de acetato de plomo en agua fueron las siguientes: 1.4 y 1.7g. Las dosis fueron aplicadas a ratas de 8 días de gestación, cuando se

trató de una sola dosis. Para cada dosis se estudiaron un promedio de 36 embriones procedentes de 3 ratas gestantes como mínimo para comprobar los resultados. Hubo dosis repetidas los días 8, 9, y 10 de gestación de 1.7g. de acetato de plomo.

De esta manera se tuvieron los siguientes grupos:

Grupos		Tipo de tratamiento
1	Control	A estas ratas se les dio una dieta de agua y alimento <i>ad libitum</i> .
2	Blanco de acetato de potasio	Se les dio a estas ratas una dosis de 1.7g. de acetato de potasio.
3	Acetato de plomo	A este grupo se les dio una dosis de 1.4g. de acetato de plomo.
4	Acetato de plomo	Las ratas se trataron con una dosis de 1.7g. de acetato de plomo.
5	Acetato de plomo	La dosis administrada fue de 1.7g. de acetato de plomo repetida 3 veces.

La disección de embriones se llevó a cabo bajo microscopio estereoscópico de la siguiente manera: las ratas gestantes se sacrificaron por inhalación de bióxido de carbono y fueron sometidas a operación cesárea, se extrajo el útero, de éste se observaron los conceptus y finalmente se extrajeron los embriones. Se trabajó con ellos para observar sus características morfológicas y se determinaron las anormalidades que se presentaron. Durante su estudio los embriones se mantuvieron en solución salina isotónica para evitar modificación anatómica.

De cada rata se registraron los siguientes datos:

# de rata	
Dosis aplicada	
Fecha de tapón vaginal	
# de productos	
# de embriones normales	
# de embriones anormales	
# de resorciones	
# de somitas normales	
# de somitas anormales	
Longitud cráneo-caudal	
Tipos de anomalías encontradas	
Descripción de anomalías	

La edad embrionaria se confirmó usando el número de somitas y longitud cráneo-caudal global de todas las ratas analizadas. De acuerdo al siguiente cuadro.

Cuadro 4. Parámetros morfológicos de embriones de rata. Los parámetros morfológicos indican un incremento lineal en relación a la edad.

EDAD	n	SOMITAS	LCC	LC	SV
9.5	5	0	-	-	1
10.4	10	9.4±1.66	2	1	3
10.8	5	16.4±1.36	3	1.5	4
11.3	4	20.4±1.14	3	1.5	4
15	10	29.8±1.5*	12±0.9	7.1±0.6	
RN	5		49±1.5	15.4±1.2	

(García-Alcocer y col., 2001).

n= número de muestras

LCC= longitud cráneo-caudal

LC= longitud craneal

SV= saco vitelino

*en la región caudal

Métodos estadísticos.

La prueba estadística que se utilizó fue la prueba de hipótesis para la comparación de medias poblacionales. Se fundamenta en establecer una hipótesis alternativa acerca de las diferencias que las medias poblacionales y trabajar con una hipótesis opuesta nula (H_0), de que ambas medias son iguales para demostrar que no hay suficiente evidencia para sostener esta igualdad y por lo tanto rechazarla a favor de la alternativa con un riesgo α que es la probabilidad de rechazar H_0 , dado que es verdad.

Nuestra H_0 fue $\mu_1 = \mu_2$ y H_a fue $\mu_1 \neq \mu_2$

Se utilizó la prueba de t de Student, con la siguiente fórmula:

$$t = \frac{(\bar{y}_1 - \bar{y}_2) - 0}{s_p (1/n_1 + 1/n_2)^{1/2}}$$

Donde:

$(\bar{y}_1 - \bar{y}_2)$ = la diferencia real entre las medias experimentales.

0 = el valor de la hipótesis nula, que significa que $\mu_1 = \mu_2$

s_p = desviación estándar mancomunada = $((n_1s_1^2 + n_2s_2^2) / (n_1 + n_2 - 2))^{1/2}$

n_1 y n_2 = número de observaciones en las muestras 1 y 2.

La región de rechazo se define con el valor crítico de $t_{\alpha/2}$ para $\alpha = 0.05$ y $v = n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad para la prueba.

La hipótesis nula se rechaza cuando el valor obtenido para t con la fórmula es mayor que el dado por la tabla, al nivel de error $\alpha = 0.05$ elegido (Mendenhall y col., 1994).

RESULTADOS.

Con el propósito de precisar que los embriones hubieran sido tratados a la misma edad se midió la longitud cráneo caudal y el número de somitas a 65 productos, los resultados indican una media de 3.6 ± 0.15 ee y para la longitud cráneo-caudal de 25.4 ± 0.50 ee. Los datos son consistentes con los presentados en el cuadro de parámetros morfológicos y bioquímicos de embriones reportados por García-Alcocer, 2001 (Figura 8) durante la neurulación.

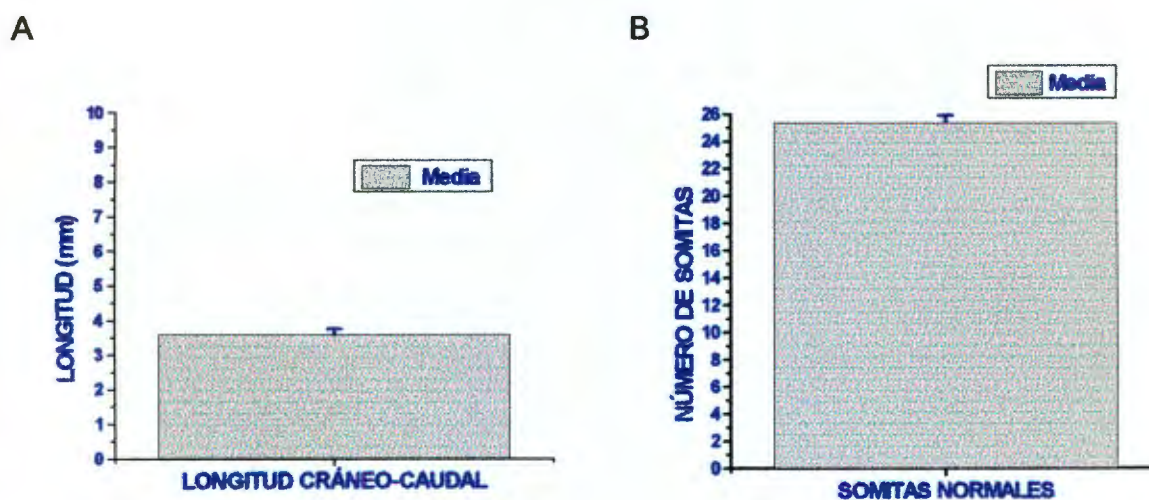


Figura 8. Confirmación morfológica de la edad embrionaria. Para confirmar la edad embrionaria se decidió medir la longitud cráneo caudal y contar el número de somitas a 65 embriones. A) En la figura se presentan los resultados obtenidos de la medición de la longitud cráneo caudal en 65 embriones provenientes de 5 ratas gestantes, el eje de las abscisas corresponde a la longitud cráneo-caudal y el eje de las ordenadas la longitud en milímetros. La altura de las barras representa la media de 3.6 ± 0.15 ee. B) Número de somitas, en el eje de las abscisas se indican las somitas y en el eje de las ordenadas el número de éstas. La altura de las barras indica una media de 25.4 ± 0.50 ee.

El trabajo experimental se llevó a cabo con 5 grupos diferentes, cada uno de aproximadamente 40 embriones como mínimo para su estudio, provenientes de 3 o más ratas gestantes.

Grupo Control. Se planearon experimentos con el propósito de conocer las alteraciones espontáneas. La media de resorciones y embriones anormales es 0.8 ± 0.37 ee (Figura 9). Se analizaron 65 productos provenientes de cinco ratas gestantes. El promedio para embriones normales es de 12.2 ± 0.58 ee, para embriones anormales de 0.4 ± 0.24 ee, en las resorciones de 0.4 ± 0.24 ee y la suma de embriones anormales con resorciones tiene una media de 0.8 ± 0.37 ee.

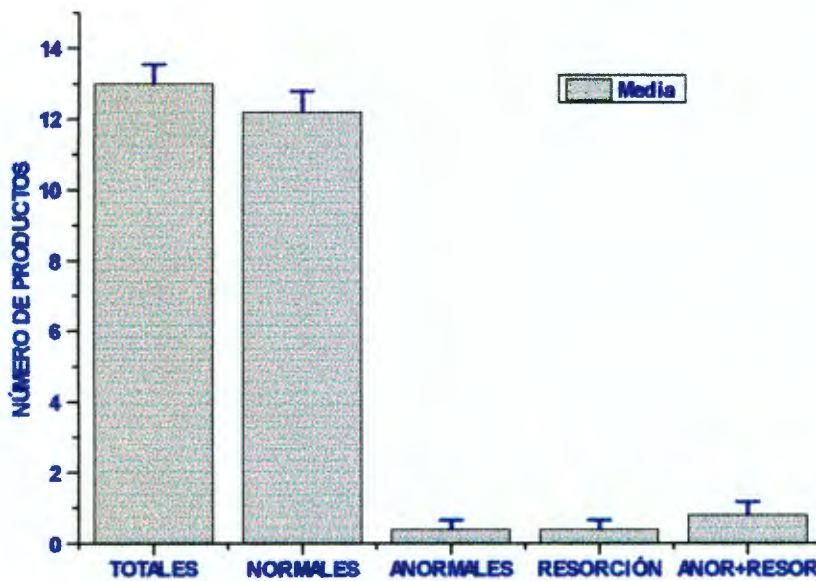


Figura 9. Grupo Control. Las ratas control se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*. En el eje de las abscisas se describen los diferentes productos estudiados y en el eje de las ordenadas el número obtenido. La altura de las barras corresponde al promedio de productos descritos en el eje de las abscisas. Se analizaron 65 productos provenientes de cinco ratas. ($n = 5$). La media de embriones normales es de 12.2 ± 0.58 ee, la de embriones anormales de 0.4 ± 0.24 ee, en las resorciones de 0.4 ± 0.24 ee y la suma de embriones anormales con resorciones tiene una media de 0.8 ± 0.37 ee. Nótese que la media de resorciones y embriones anormales es muy baja.

Al comparar los resultados estadísticos entre los grupos control y blanco, no existe diferencia con un α de 0.05 en los embriones anormales, así como en la suma de embriones anormales más resorcciones.

Grupo Blanco. Debido a que el plomo se administró como una sal de acetato, se precisó conocer si el acetato causaba alguna alteración en el desarrollo, para ello se planearon experimentos en los que se administró 1.7g de acetato de potasio y se estudiaron 41 productos provenientes de tres ratas tratadas.

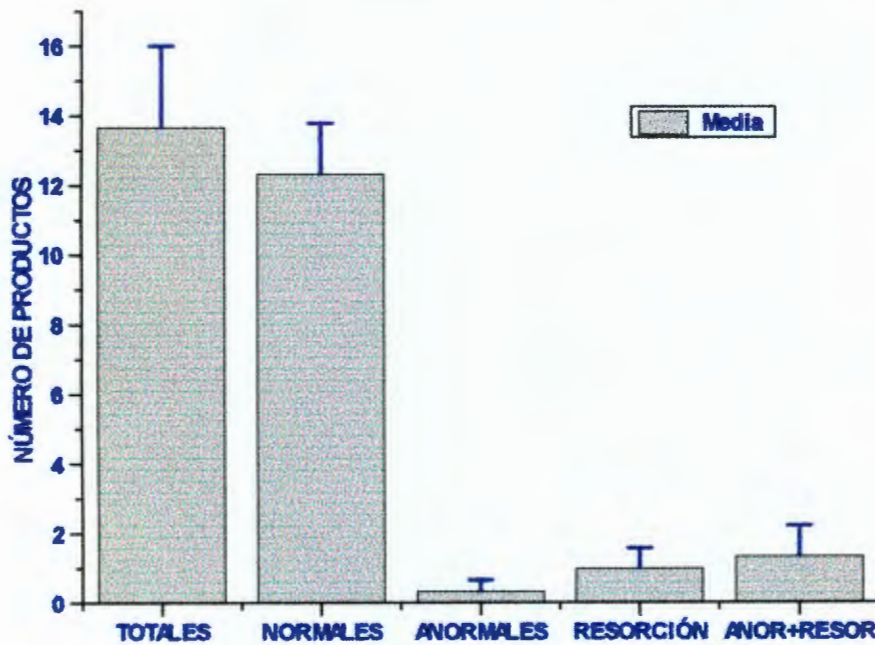


Figura 10. Grupo Blanco. En la figura se representan los resultados obtenidos al tratar tres ratas gestantes con 1.7g de acetato de potasio. En el eje de las abscisas se indican los diferentes productos, en el eje de las ordenadas el número de ellos. La altura de las barras corresponde al promedio de productos descritos en el eje de las abscisas. Se estudiaron 41 productos provenientes de tres ratas en estudio. ($n=3$). El promedio para embriones normales es de 12.33 ± 1.45 ee, para embriones anormales de 0.33 ± 0.33 ee, en las resorcciones de 1 ± 0.57 ee y la suma de embriones anormales con resorcciones tiene una media 1.33 ± 0.88 ee.

Los resultados indican una media de 12.33 ± 1.45 ee para embriones normales, de 0.33 ± 0.33 ee en embriones anormales, de 1 ± 0.57 ee en las resorciones y la suma de embriones anormales con resorciones de 1.33 ± 0.88 ee (Figura 10).

La anomalía encontrada en este grupo fue la flexión invertida que consiste en que la curvatura del embrión normalmente es hacia adentro, en cambio en la flexión invertida la curvatura es hacia fuera.

Grupo Acetato de Plomo 1.4g. A este grupo se le aplicó una dosis de 1.4g de acetato de plomo, con el propósito de conocer las anomalías o alteraciones que existen al ingerir plomo.

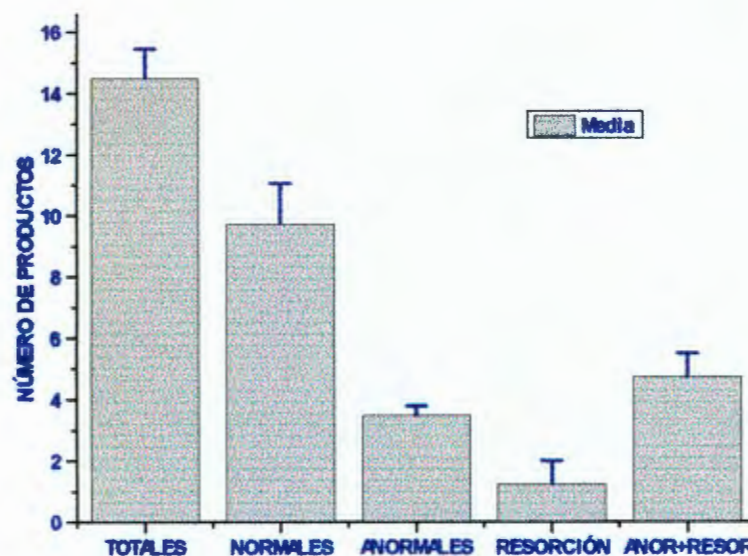


Figura 11. Grupo Acetato de plomo 1.4g. Se aplicó 1.4g. de acetato de plomo. En el eje de las abscisas se indican los diferentes productos estudiados, en el eje de las ordenadas el número de los mismos. La altura de las barras corresponde al promedio del número de productos descritos en el eje de las abscisas. Se analizaron 58 productos provenientes de cuatro ratas en estudio. ($n = 4$). Los resultados indican una media de 9.75 ± 1.31 ee para embriones normales, para embriones anormales de 3.5 ± 0.28 ee, en las resorciones se tiene una media de 1.25 ± 0.75 ee y la suma de embriones anormales con resorciones de 4.75 ± 0.75 ee. Nótese que la suma de embriones anormales más resorciones es mucho mayor que en el grupo control y blanco.

La dosis reportada como LD para ratas Sprague Dowley por UMWELTBUNDESAMT, 1986, no coincide con los resultados de este trabajo, porque al administrar la LD₅₀ no muere ninguna rata. Se analizaron 58 productos provenientes de cuatro ratas en estudio. Las medias son para embriones normales de 9.75 ± 1.31 ee, para embriones anormales de 3.5 ± 0.28 ee, en las resorciones de 1.25 ± 0.75 ee y en la suma de embriones anormales con resorciones de 4.75 ± 0.75 ee. Los resultados indicados en la figura 11 nos muestran que la suma de embriones anormales más resorciones es mayor que en el grupo control, dentro de las anormalidades se encuentran 4 aplasias generalizadas que consisten en la disminución de 50% o más del tamaño del embrión, también se observó una microcefalia, en donde el tamaño de la cabeza del embrión es menor al de un embrión normal. Otras anormalidades se refieren a deficiencia en la formación de vesículas cerebrales (2), embriones muy vascularizados (2), defectos del tubo neural (3) y flexión invertida. Al comparar los resultados entre el grupo control y el grupo 1.4g, se encontró diferencia estadística con un α de 0.05 en los embriones anormales y en embriones anormales más resorciones. Al llevar a cabo la comparación entre el grupo blanco y el grupo 1.4g. tiene significancia en las medias de embriones anormales, pero con respecto a embriones anormales más resorciones no se encontró diferencia significativa.

Grupo Acetato de Plomo 1.7g. A este grupo se le administró una dosis de 1.7g. de acetato de plomo. Con la idea de determinar las alteraciones que causa una dosis más alta que la reportada como LD₅₀, se observó que tampoco moría ninguna rata. Se analizaron 42 productos provenientes de tres ratas en estudio. Las medias para los diferentes embriones fueron: para normales de 10 ± 0.57 ee, para embriones anormales de 3.33 ± 0.66 ee, en las resorciones de 0.66 ± 0.66 ee y la suma de embriones anormales con resorciones de 4 ± 1.15 ee. Dentro de las anormalidades encontradas destacan las aplasias generalizadas (4), se presentaron otras como son: microcefalia, flexión invertida (2), deficiencia en el cierre del tubo neural (2) y embrión muy vascularizado (1).

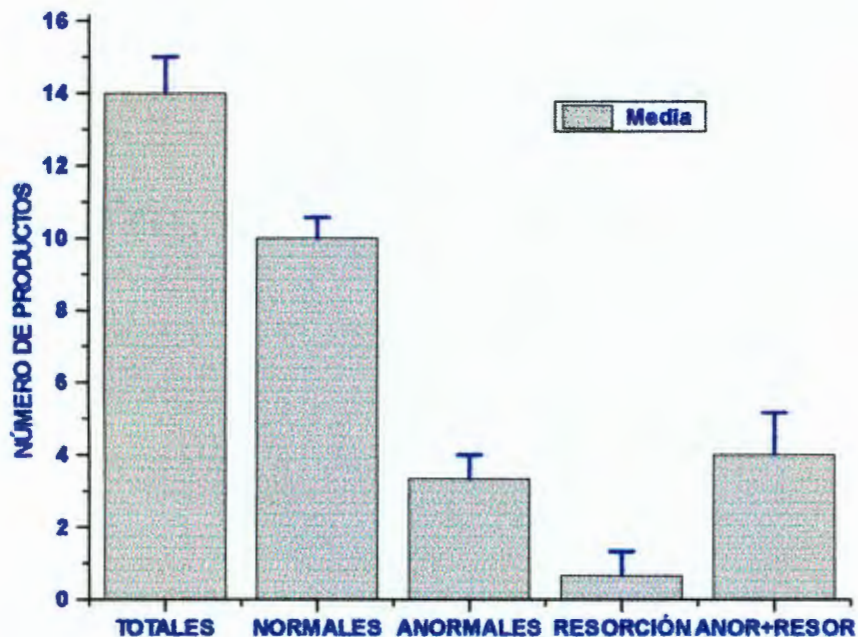


Figura 12. Grupo Acetato de plomo 1.7g. Se aplicó 1.7g. de acetato de plomo a tres ratas gestantes. En el eje de las abscisas se indican diferentes productos estudiados, en el eje de las ordenadas el número de los mismos. La altura de las barras corresponde al promedio del número de productos descritos en el eje de las abscisas. Se analizaron 42 productos provenientes de tres ratas en estudio. (n =3). La media para embriones normales es de 10 ± 0.57 ee, para embriones anormales de 3.33 ± 0.66 ee, en las resorciones de 0.66 ± 0.66 ee y en la suma de embriones anormales con resorciones de 4 ± 1.15 ee.

Al comparar este grupo con el control, se encontró diferencia significativa en embriones anormales, así como en la suma de embriones anormales más resorciones con un $\alpha=0.05$. Con el grupo blanco también existe significancia en embriones anormales, pero no en embriones anormales más resorciones. Comparando los datos con el grupo de 1.4g de acetato de plomo no se encontró significancia.

Grupo Acetato de plomo 1.7g. en dosis repetidas. Con el fin de determinar las alteraciones causadas por dosis repetidas de acetato de plomo se les administró 3 días consecutivos la dosis de 1.7g. de acetato de plomo. Se analizaron 52 productos provenientes de cuatro ratas en estudio (Figura 13). Las medias observadas fueron: para embriones normales de 7.8 ± 1.74 ee, para embriones anormales de 2.8 ± 0.58 ee, en las resorciones de 2.6 ± 1.32 ee y en la suma de embriones anormales con resorciones se tiene una media de 5.4 ± 1.24 ee. Se registraron nuevamente aplasias generalizadas (8) y flexiones invertidas (3).

Al llevar a cabo una comparación entre los resultados de este grupo y el control se encontró diferencia significativa en los embriones anormales y en la suma de éstos más resorciones con α de 0.05. Entre embriones anormales con respecto al grupo blanco, no existe significancia, contrario al comparar entre embriones anormales más resorciones.

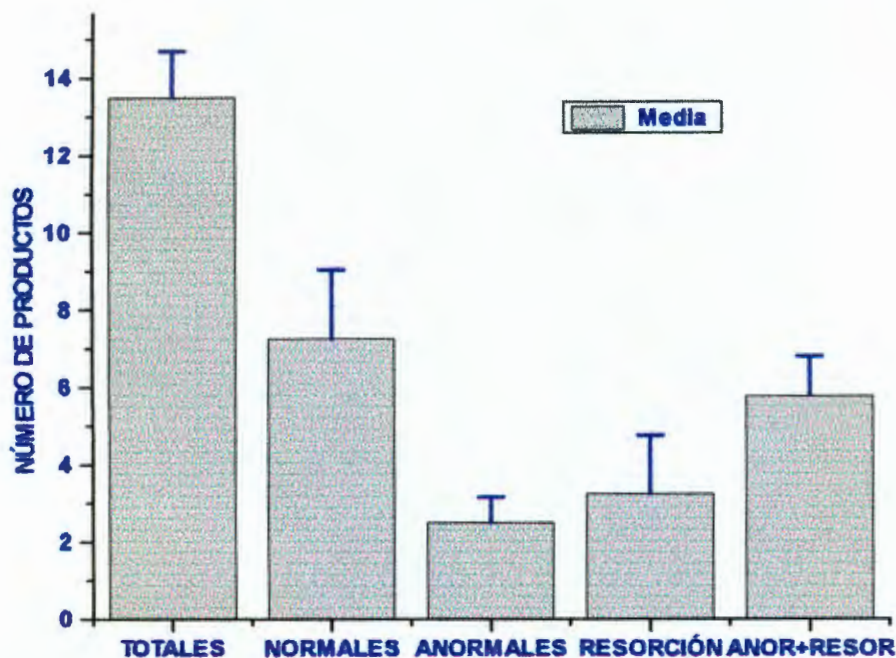


Figura 13. Grupo Acetato de plomo 1.7g en dosis repetidas. Se aplicaron dosis repetidas de 1.7g de acetato de plomo a cuatro ratas gestantes. En el eje de las abscisas se indican diferentes productos estudiados, en el eje de las ordenadas el número de los mismos. La altura de las barras corresponde al promedio del número de productos descritos en el eje de las abscisas. Se analizaron 52 productos provenientes de cuatro ratas en estudio. (n =4). La media para embriones normales es de 7.25 ± 1.79 ee, para embriones anormales es de 2.5 ± 0.64 ee, en las resorciones es de 3.25 ± 1.49 ee y la suma de embriones anormales con resorciones tiene una media de 5.75 ± 1.03 ee. Nótese que la suma de embriones anormales es mayor que en los otros grupos estudiados.

Con la idea de conocer la frecuencia de cada una de las anomalías encontradas en los diferentes grupos problema se encontró (Figura 14) que la aplasia generalizada y flexión invertida predominan con un porcentaje de 40 y 26 respectivamente. Más sin embargo se observaron también embriones muy vascularizados o con anomalías encefálicas con un porcentaje de 8 para ambas. En menor frecuencia se observó microcefalia, neuroporo posterior abierto,

embriones sin primordio cardiaco, deficiencia del cierre del tubo neural y prosencéfalo abierto. En total se estudiaron 273 embriones provenientes de 20 ratas gestantes.

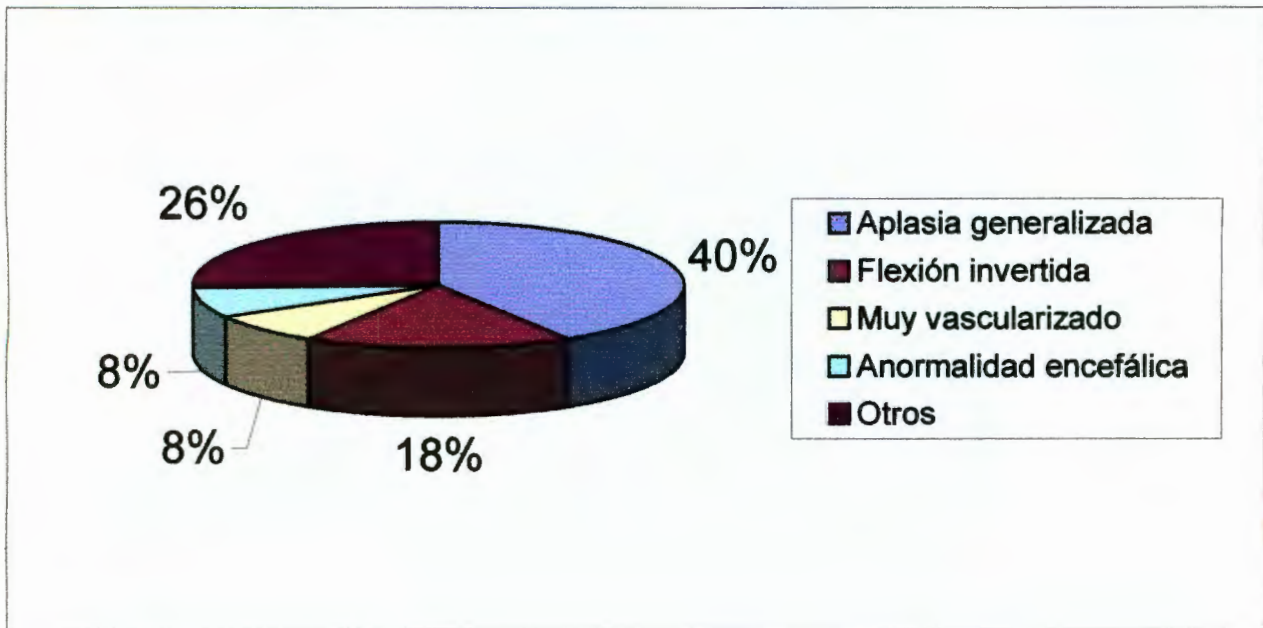


Figura 14. Distribución de las anomalías. La figura indica las anomalías halladas durante todo el proceso experimental, es decir comprende el estudio de 273 embriones provenientes de 20 ratas gestantes. Nótese que las anomalías que se presentaron con mayor frecuencia son la aplasia generalizada que se caracteriza por una disminución del 50% o más tamaño del embrión y flexión invertida. Se encontraron 8% de anomalías encefálicas igual que la vascularización elevada. El término otros incluye anomalías como microcefalia, deficiencia en el cierre del tubo neural y deficiencia del primordio cardiaco, todas éstas nos dan un porcentaje de 26.

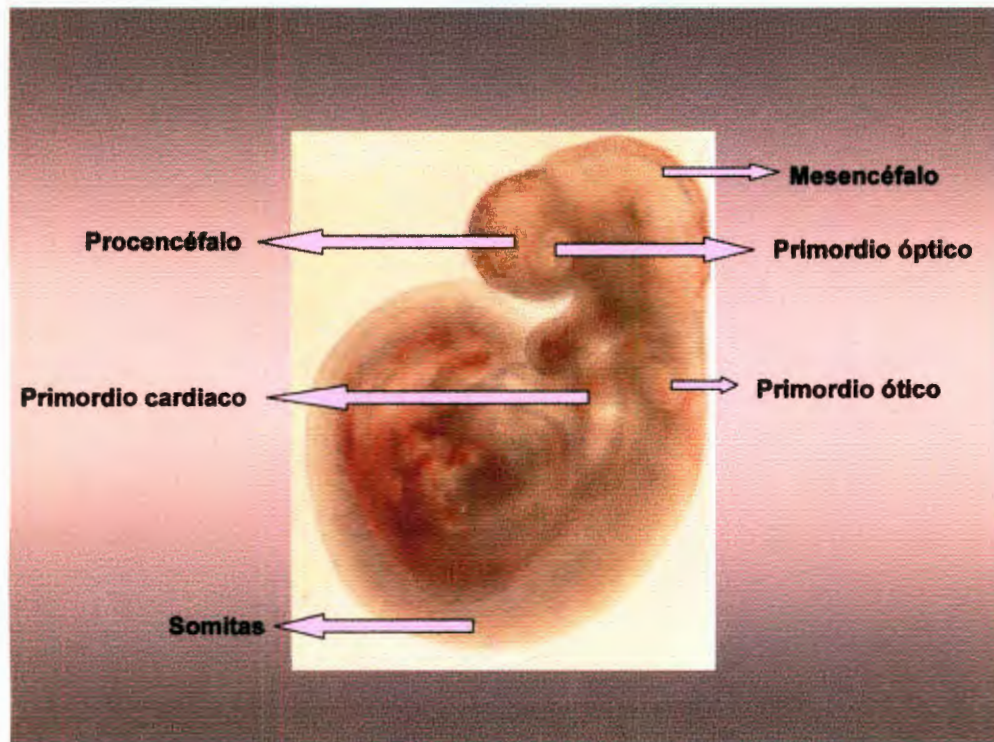
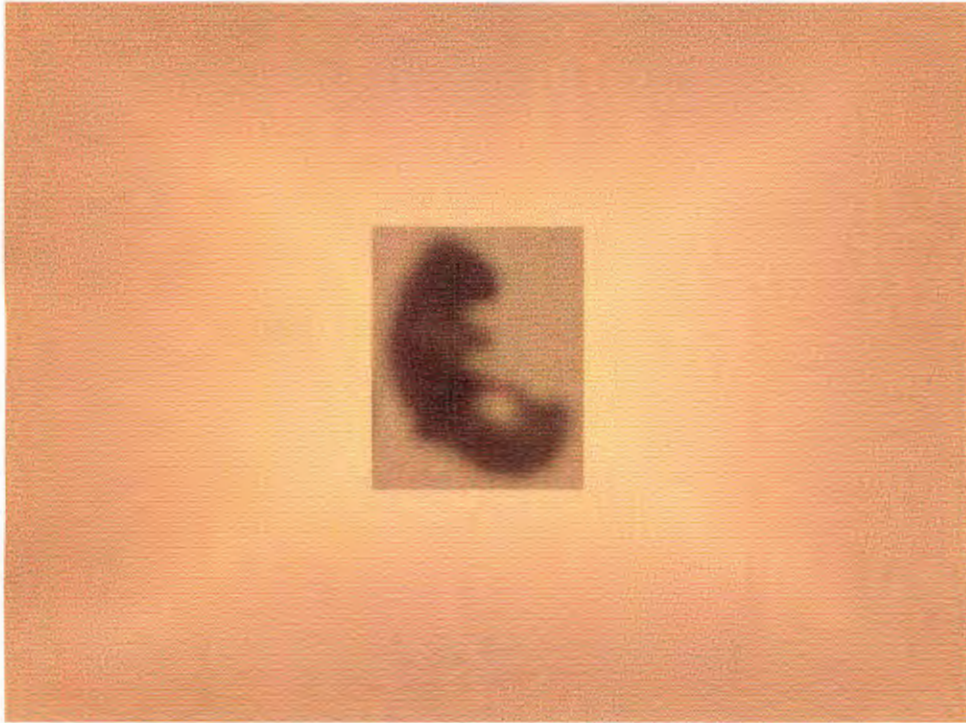
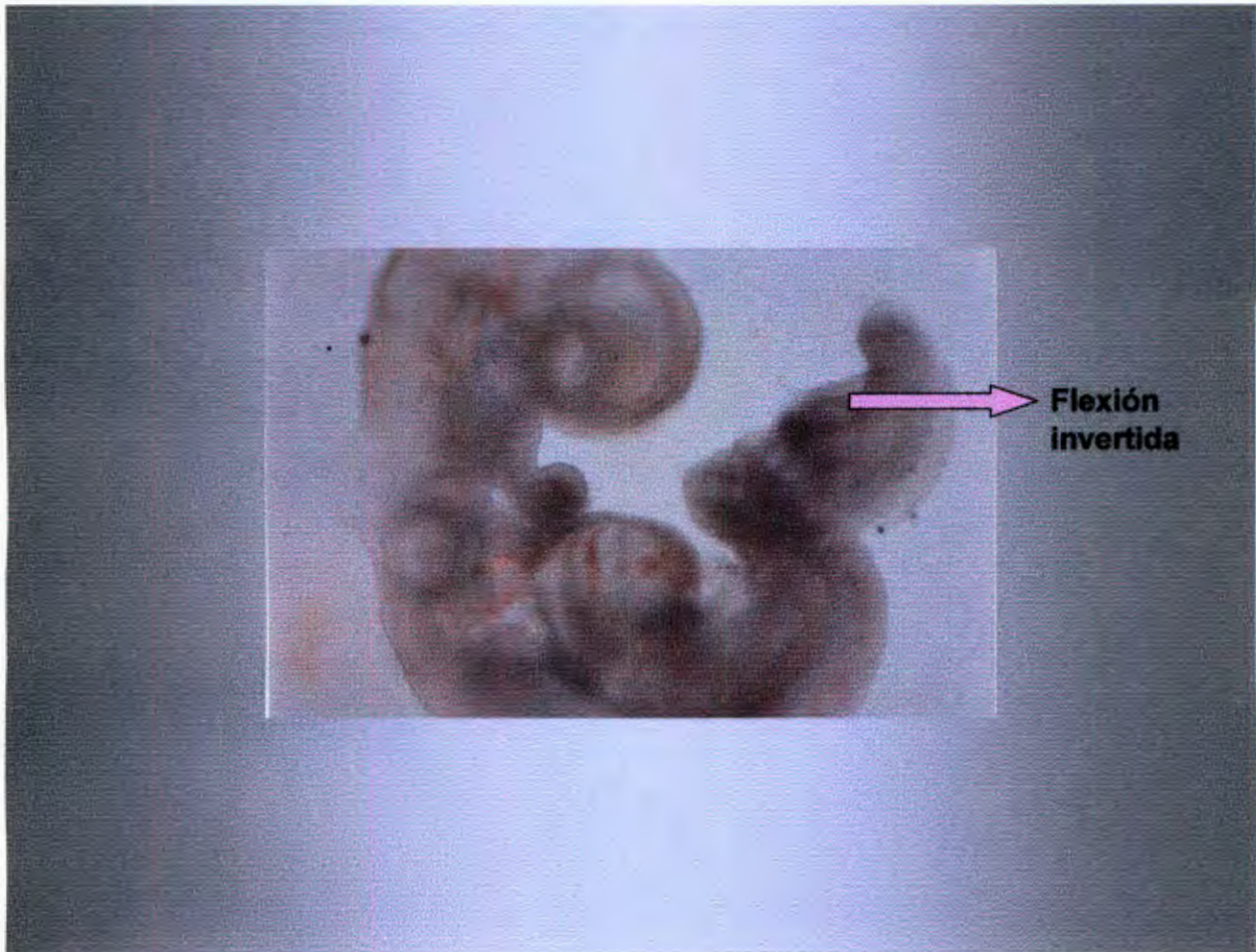


Figura 15. Estructura de un embrión normal. La figura muestra la posición lateral de un embrión de 11 días de edad gestacional, con una longitud cráneo-caudal de 3.2 mm y una longitud craneal de 1.6 mm. Nótese la presencia normal del primordio ótico, primordio óptico, así como el prosencéfalo y mesencéfalo. El neuroporo posterior está cerrado y la curvatura del tubo neural es hacia adentro, el número y forma de los somitas es normal.



1 mm.

Figura 16. Estructura de embrión anormal. Efecto del acetato de plomo en embriones de rata. El acetato de plomo se aplicó a las ratas gestantes, a dosis repetidas de 1.7g. La anomalía que se observó frecuentemente fueron aplasias generalizadas n=16. Obsérvese la disminución considerable del tamaño del embrión, la longitud cráneo-caudal es de 1.6 mm.



1 mm.

Figura 17. Efecto del acetato de plomo en embriones de rata. Se aplicaron dosis repetidas de 1.7g. de acetato de plomo. Se observa en la figura flexión invertida (n=7), con una longitud cráneo-caudal de 3 mm. Nótese que la curvatura del neuroporo posterior está orientado hacia fuera, provocando un enrollamiento de la cola del embrión.

DISCUSIÓN.

Se comprobó la edad embrionaria mediante parámetros morfológicos como fueron: la medición de la longitud cráneo-caudal y el número de somitas a 65 productos. Los resultados coincidieron con los reportados por García-Alcocer y *col.*, 2001 por lo que, con esto se comprueba que las ratas gestantes recibieron su tratamiento con plomo en la etapa de desarrollo que coincide con el inicio de la neurulación, es decir, el día 8 de gestación. Esto es importante ya que se estudiaron las alteraciones genéticas que existen durante la neurulación de la rata por efecto de la ingestión de acetato de plomo.

Grupo Control. Se analizaron 65 productos provenientes de 5 ratas tratadas. De los cuales, sólo dos embriones presentaron anormalidades. Es posible que éstas sean debidas a alguna mutación, se sabe que las mutaciones son cambios en la secuencia del DNA de un gen, y ocurren espontáneamente en la naturaleza. Se tiene conocimiento de que las mutaciones espontáneas tienen su origen en una diversidad de causas, que incluyen los errores en la replicación, las lesiones espontáneas, y los elementos genéticos transponibles. Las mutaciones espontáneas son muy poco frecuentes debido a que las células han desarrollado una serie de sistemas enzimáticos que reparan los daños del DNA de diversas maneras, es posible que la deficiencia de alguno de estos sistemas conduce a un aumento de la tasa de mutación (Griffiths y *col.*, 2000). Entonces, la actividad de algún gen pudo haber sido bloqueado o desactivado y si estos mismos genes hubieran sido responsables de activar o desactivar a otros genes involucrados en dicha formación del embrión, ésta sería la causa de las anormalidades. O lo contrario, suponiendo que la actividad de un gen es bloquear o desactivar a otros genes responsables del correcto desarrollo del embrión, pero dicho gen es anulado o desactivado, entonces se provocaría una cascada de errores, lo cual llevaría a las anormalidades observadas (Anderson, 1995).

Es posible que los cambios espontáneos pudieran relacionarse con condiciones a las que fueron expuestas las ratas de experimentación como alimento, agua, aire, etc. La expresión de un gen puede depender de otros factores, como: el tipo de célula, las circunstancias, la edad y las señales extracelulares, (Griffiths y col., 2000). Para reducir tal riesgo, las ratas se mantuvieron en las mismas condiciones alimenticias, de temperatura, no recibieron ningún tratamiento, tenían la misma edad y eran del mismo tipo.

Grupo Blanco. En este grupo hubo la presencia de dos anormalidades que no son significativas al compararlas con el control, sin embargo puede deberse como en el control a una mutación espontánea, así como, a alguna alteración debida a la dieta o agua consumidas. Otra posibilidad es que el acetato de potasio haya alterado el ambiente. En ocasiones, los agentes ambientales provocan ciertas reacciones químicas de la misma manera que lo hacen las mutaciones, originando cambios fenotípicos no hereditarios que se semejan a los causados por las mutaciones (Gardner, 1974). También es posible que la actividad de un gen responsable del correcto desarrollo del embrión se haya bloqueado, o bien haya participado en la modulación de otros genes involucrados en el desarrollo del embrión (Anderson, 1995).

Grupo Acetato de plomo 1.4g. En este grupo no hubo diferencia significativa al comparar el grupo control y blanco. Sin embargo, las anormalidades encontradas se relacionan con deficiencias en la formación de vesículas cerebrales, aplasia generalizada y flexión invertida.

Esta dosis se utilizó porque es la reportada como LD₅₀, por UMWELTBUNDESAMT, 1986, sin embargo, al llevar a cabo este experimento, no se obtuvo el efecto de LD₅₀, ya que no murió ninguna rata a causa de esta concentración. Es posible que pueda deberse a la especie de rata, a la edad, o a las condiciones (temperatura, alimento), en las que fueron expuestas las ratas.

La presencia de resorciones encontradas en las ratas en estudio, puede relacionarse con que el plomo interfiere con la expresión de algún gen o genes, cuya responsabilidad es el desarrollo correcto del embrión. Hay que mencionar que la expresión o no expresión de un gen depende de diversos factores como el tipo de célula, las circunstancias, la edad y las señales extracelulares (Griffiths y *col.*, 2000). También es posible que el plomo pudiera intervenir en la desactivación o activación de un gen que participe en la actividad de otros genes que originen cambios fenotípicos en el embrión (Anderson, 1995). Esto es posible porque el plomo puede atravesar barreras como la placentaria y la hematoencefálica (Gisbert, 1998) y además es un catión divalente que puede competir con calcio o zinc (Goodman, 1996).

También se conoce que el plomo puede inhibir ciertas enzimas, tales como la ALA-D y la adenilatociclasa, así como interferir en el transporte de ácido glutámico y el metabolismo cerebral al reducir el GABA (Gisbert, 1998). Si estas enzimas se formaran en los embriones tempranos podrían asociarse a las anomalías encefálicas y microcefalia encontradas. Ya que entonces se pudo haber activado o desactivado gen o genes locales encargados de la producción de dichas enzimas. La pregunta es ¿cómo puede el plomo inhibir estas enzimas cerebrales?, probablemente porque inhibe a los genes encargados de la producción de las proteínas; ya sea por errores en la replicación, por lesiones espontáneas o por elementos genéticos transponibles. Los factores del medio externo y las enzimas, pueden participar en la regulación de la actividad genética (Gardner, 1974), pues se sabe que las enzimas juegan un papel crucial en la reducción de las lesiones genéticas celulares, mismas que pueden ser provocadas por mutágenos, que reemplacen una base del DNA, alterar una base de manera que empareje erróneamente con otra, o dañar una base de modo que, en condiciones normales, no pueda emparejar con ninguna (Griffiths y *col.*, 2000). Entonces si estas enzimas no se produjeron o lo hacen con deficiencia pueden alterar la expresión genética. Con cualquiera de las posibilidades anteriores se pudo dar origen a los cambios fenotípicos encontrados, porque se pudieron producir otras proteínas que no

activarían a los genes responsables del correcto desarrollo del embrión, o al existir estos errores, no se activaron los genes correctos o lo contrario se bloquearon.

Otra posibilidad es que por la ausencia de las proteínas, inhibe también a una cascada de reacciones que pueden alterar la activación de genes, dando origen a deformaciones en los embriones. Por ejemplo la adenilatociclasa que cataliza la reacción de ATP a AMP cíclico y se sabe que éste estimula la transcripción de algunos genes en el RNA mensajero y en la traducción del código de RNA mensajero en proteína (Bowman y *col.*, 1984). Es decir, que por no haberse formado la o las proteínas adecuadas, se inhibe también la activación de otros genes y de esta manera el desarrollo correcto del embrión.

Entre las anomalías encontradas en este grupo están las aplasias generalizadas, esto pudo ser debido a que el plomo origina deficiencia generalizada de alguna proteína crucial, lo que hace imposible el crecimiento en general o altera genes en células pluripotenciales donde éstas darán origen a otras células que estarán comprometidas a un único destino (Anderson, 1995; Melton y *col.*, 1997). Las células pluripotenciales entonces son capaces de autorreproducirse, proliferar y diferenciarse en otras células (Griffiths y *col.*, 2000).

Por otra parte, las anomalías que se presentan en este grupo pueden ser debidas a que en el día 8 del tratamiento, algunos genes estaban activos y otros inactivos, los activos en esa etapa de desarrollo probablemente fueron bloqueados o mutados, de manera que no permitieran el correcto desarrollo del embrión. Como por ejemplo aquellos genes que codifican para las proteínas BCD y HB-M, las cuales son factores de transcripción y establecen la información de la posición del eje antero-posterior del soma (Wurst y *col.*, 1994), ya que se sabe que la concentración de las dichas proteínas dependen de dos especies de mRNA (Griffiths y *col.*, 2000). O aquellos genes que estaban inactivos, se activaron, dando por resultados alteraciones en el desarrollo. Se sabe también que el mRNA de HB-M es bloqueado por la proteína NOS (proteína represora de la traducción),

entonces es posible que los genes que codifiquen para la proteína NOS sean alterados, de esta manera no se codificará dicha proteína y por lo mismo la alteración a su función provocará errores en la posición del eje A-P.

Grupo Acetato de plomo 1.7g. Ya que la LD₅₀ reportada por UMWELTBUNDESAMT, 1986, no estaba teniendo dicho efecto, se aumentó la concentración, con la que hipotéticamente se moriría un 62% de la población, pero tampoco hubo tal efecto, esto puede ser debido a las mismas razones mencionadas en el grupo 1.4g.

Las alteraciones genéticas causadas por el acetato de plomo se pueden relacionar con cambios en células somáticas provocadas por el plomo. Los cambios somáticos ocurren en una sola célula del tejido en desarrollo, esta célula será progenitora de una población de células mutantes idénticas, (Griffiths y col., 2000).

Grupo Acetato de plomo 1.7g. en dosis repetidas. Comparando con el control, el grupo 1.7g. de dosis repetidas presenta una diferencia significativa tanto en la incidencia de anomalías como en la de resorciones. Las anomalías observadas fueron: aplasia generalizada y flexión invertida. Esto sugiere que el plomo provoca alteraciones genéticas durante la neurulación de las ratas originando tales anomalías en los embriones, y en muchos casos resorciones. No hay diferencia significativa en las anomalías encontradas con una o 3 dosis. Es posible que la susceptibilidad al efecto del plomo sea en el inicio de la neurulación y posteriormente disminuya de tal suerte que no hay significancia. De cualquier forma la exposición prolongada a acetato de plomo provoca que los embriones estén en contacto continuo por más tiempo con el plomo, ya que éste es difícil que se metabolice y se elimine, provocando un efecto mayor sobre los genes. Los resultados de este trabajo coinciden con los reportados por Greene y col., 1990, donde encontraron que la exposición baja de niveles de plomo afecta el tamaño del feto, al analizar los resultados obtenidos se encontró que existe una persistente aparición de aplasias generalizadas, que comprenden una disminución

considerable del tamaño del embrión, lo que confirma dicha conclusión. Entonces ahora se sabe que el crecimiento intrauterino se ve restringido por efecto del acetato de plomo, más aún si las concentraciones de acetato de plomo son repetidas, es decir que las exposiciones repetidas de plomo prenatal tienen efectos acumulativos ocasionando alteraciones en el tamaño del embrión. Esto se puede deber a que el plomo actúa como inhibidor de un gen o genes, originando deficiencia de las proteínas que son necesarias para la división celular, de esta manera se genera una masa celular disminuida, originando así la aplasia.

La anomalía que se presentó con mayor frecuencia fueron las aplasias generalizadas. Esto puede relacionarse con una perturbación del proceso de diferenciación celular, que originan deficiencia de las proteínas necesarias para la división celular (Guízar, 1988). Entonces, debido a la aplicación de dosis repetidas de 1.7g. de acetato de plomo, posiblemente se inhibió el proceso de diferenciación celular, aquellos genes activos en ese momento fueron inhibidos o tal vez mutados provocando un desarrollo defectuoso del embrión.

Más aún, se conoce que la talla está determinada por la interacción de factores genéticos y ambientales. Los factores genéticos determinan las potencialidades máximas de crecimiento, y los ambientales son determinantes importantes de la magnitud en que se expresan esas potencialidades. (Guízar, 1988). Por esta razón, puede actuar como un factor ambiental, controlando aquellos genes involucrados en el desarrollo del embrión, que provocan disturbios en la activación y desactivación de genes. Por otra parte, el déficit en el crecimiento lineal en pacientes con talla baja determinada genéticamente está dado en su mayor parte por un efecto genético mayor, esto es, por genes mutados autosómicos o ligados al cromosoma X; pero la talla final está influenciada por el efecto aditivo de otros genes y del ambiente (Guízar, 1988).

Se observó en este grupo un aumento considerable en las resorciones, lo que concuerda con los estudios realizados por Jacquet y *col.*, 1979, en donde a ratas

gestantes se les inyectó intraperitonealmente 15 o 35 mg de acetato de plomo sobre kilogramo a los 8, 9, 10 y 12 días de gestación. Se observó un aumento en la mortalidad de postimplantación con anomalías en los esqueletos de los fetos. Las anomalías fueron en la parte anterior del esqueleto axial y consistía básicamente en la fusión de dos o más vértebras cervicales. Asimismo, se observó disminución en el peso. En este estudio las dosis administradas fueron mucho menores, pero se aplicaron durante 5 días, aun así, ya se observan anomalías en los embriones, y un aumento en las resorciones. Por otra parte, se aplicó la dosis sólo durante la neurulación. Es posible que Jacquet no sólo afectó a genes activos o inactivos de la neurulación, sino además a otros de una etapa de desarrollo, por tal razón con una dosis pequeña de acetato de plomo pudo provocar más alteraciones en el desarrollo de los embriones.

Los resultados de este trabajo concuerdan también con los obtenidos por Jacquet y *col.*, 1975 en donde a ratas gestantes se les dio una dieta de 0, 0.125, 0.250 y 0.500% de acetato de plomo, éstas fueron disectadas 16 a 18 días después, se encontró que el plomo reduce significativamente la incidencia de embarazos y aumenta la pérdida de postimplantación en ratas gestantes.

Asimismo, un estudio realizado por Gupta y *col.*, 1995, demuestra que la administración de plomo reduce el porcentaje de reproducción así como el número de embriones viables. El tratamiento consistió en una dieta de acetato de plomo en días alternados durante 4 semanas antes de cruzar las ratas y de 3 a 4 semanas hasta el embarazo. Todos estos estudios confirman los resultados que obtuvo en este trabajo, pues también se encontró una disminución en el número de embriones viables, así como alteraciones en el desarrollo de los embriones. Sin embargo, las aportaciones indican que además de la viabilidad se observaron las diferentes anomalías.

Se define como teratógeno aquella sustancia que provoca anomalías en los embriones, entonces el acetato de plomo efectivamente es un teratógeno, pero hay

que mencionar que de acuerdo a los resultados obtenidos aquellas ratas expuestas a 1.4g. y 1.7g. de acetato de plomo no tienen efectos ascendentes de acuerdo a la dosis administrada, es decir los resultados no mostraron un efecto de dosis-respuesta en este rango de concentración aplicada. Los resultados de este trabajo difieren de lo reportado por Varnagy y *col.*, 1999, en donde se aplicó acetato de plomo a una dosis 0.1, 0.5, 1.0, 10 y 1000 mg/kg de peso a ratas Wistar gestantes, administrándoseles en los días 6 a 15 en donde no encontraron efecto sino hasta combinar el plomo con un pesticida llamado mancozeb en una dosis de 750 mg/ kg de peso. Sus resultados mostraron un efecto de dosis – respuesta, el acetato de plomo no fue encontrado ser teratogénico en ratas en este trabajo. En cambio en la administración combinada de acetato de plomo y mancozeb se observó que la mortalidad fetal se incrementó, posiblemente porque los efectos que se observaron fueron causados por el pesticida. Hay que destacar que las concentraciones de acetato de plomo administradas son menores que las administradas en este trabajo, aunque su administración fue también en dosis repetidas.

Los resultados sugieren que la exposición a acetato de plomo durante la etapa de neurulación afecta la expresión genética generando cambios fenotípicos en los embriones expuestos. Se observó que el acetato de plomo a dosis repetidas provoca anomalías en los embriones de rata más severas que corresponden aproximadamente al doble del número de anomalías en relación a las otras dosis. Esto nos indica que el acetato de plomo se va acumulando en el organismo, y que su eliminación es sumamente lenta. Por otra parte, la exposición constante al acetato de plomo provoca alteraciones fenotípicas en los embriones, así como un aumento en el número de resorciones.

CONCLUSIONES.

1. El ion acetato no induce cambios fenotípicos en los embriones estudiados.
2. El plomo induce aplasias generalizadas en embriones de rata durante la neurulación.
3. La exposición al acetato de plomo durante la etapa de neurulación afecta la expresión genética generando cambios fenotípicos en los embriones expuestos.
4. Al aplicar dosis repetidas en 3 días consecutivos las anomalías se incrementaron significativamente.

BIBLIOGRAFÍA.

- Alberts, B., Dennis, G. & Lewis, J. (1998). *Essential cell biology*. Garland Publishing Inc., USA, Cap. 8, pp. 257-273.
- Anderson, D. (1995). *Neuron* **15**, 1219-1222.
- Bellinger, D., Leviton, A., Rabinowitz, M., Allred, E., Needleman, H. & Schoenbaum, S. (1991). *Environ Res* **54**, 151-158.
- Bowman, W. & Rand, M. (1984). *Farmacología*. Interamericana, México, Cap. 14, pp. 216-219.
- Centers for Disease Control. (1997). Screening young children for lead poisoning: guidance for state and local public health officials. *Department of health and human services*, USA.
- Chole, D. & Richter, G. (1973). *Proc Soc Exp Biol Med* **142**, 446-449.
- Chuang, H., Schwartz, J., Gonzales-Cossio, T., Cortez, L., Palazuelos, E., Aro, A., Hu, H. & Hernández-Avila, M. (2001). *Environ Health Perspect* **109**, 527-532.
- Clark, W. (1990). *Farmacología clínica*. Médica Panamericana, México, 12^a Ed., Cap. 64, pp. 608.
- Crocetti, A., Mushak, P. & Schwartz, J. (1990). *Environ health perspect* **89**, 121-124.
- Devoto, P., Flore, G., Ibba, A., Fratta, W. & Pani, L. (2001). *Toxicol Lett* **121**, 199-206.
- Dietrich, K., Krafft, K. & Bornschein, R. (1987). *Pediatrics* **80**, 21-30.
- DVGW - DEUTSCHER VEREIN DES GAS- UND WASSERFACHES e.V. (Editor) (1985/88) Daten und Informationen zu Wasserinhaltsstoffen (Datos e información sobre sustancias contenidas en el agua) - Parte 1: 1985; Parte 2: 1988. Eschborn. Publicado en: DVGW - Schriftenreihe WASSER (Serie de publicaciones técnicas sobre AGUA, de la DVGW), N°48.
- García-Alcocer, G. y Miledi, R. (2001). *Expresión de genes para los receptores a glicina durante el desarrollo del sistema nervioso de la rata*. Querétaro. Universidad Autónoma de México. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias, 20.

- Gardella, C. (2001). *Obstetrical and Gynecological Survey* **56**, 231-238.
- Gardner, E. (1974). *Principios de genética*. Limusa, México, 2ª Ed., Cap. **15**, pp. 353-357.
- Gisbert, J. (1998). *Medicina legal y toxicología*. Masson, España, 5ª Ed., Cap. **71**, pp. 835-847.
- Goodman, A. (1996). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. McGraw-Hill Interamericana, México, 9ª Ed., Cap. **66**, pp. 1756-1758.
- González-Cossio, T., Sanin, L. & Hernández, M. (1997). El plomo daña a nuestras actuales y futuras generaciones. *Salvia* **14**, 4-5.
- Greene, T. & Emhart, C. (1990). *Neurotoxicol Teratol* **13**, 417-427.
- Griffiths, A., Gelbart, W., Miller, J. & Lewontin, R. (2000). *Genética moderna*. McGraw-Hill, España, Caps. **3, 4, 6**, pp. 52-68, 182, 202-226.
- Guízar, J. (1988). *Genética clínica*. Manual Moderno, México, Cap. **29**, pp. 376-380.
- Gupta, G., Singh, J. & Parkash, P. (1995). *Pharmacol Toxicol* **76**, 206-211.
- Jacobson, A. (1991). *Am zool* **31**, 628-643.
- Jacquet, P., Leonard, A. & Gerber, G. (1975). *Experientia* **31**, 1312-1313.
- Jacquet, P. y Gerber, G. (1979). *Biomedicine* **30**, 223-229.
- Jiménez, C. & Romieu, E. (1993). *Sal. Pú. Méx.* **35**, 599-606.
- Katzung, B. (1991). *Farmacología básica y clínica*. Manual Moderno, México, 4ª Ed., Cap. **59**, pp. 744-746.
- Laurence, K. (1974). *Lancet* **1**, 301-304.
- Laurence, K. (1993). *Hydrocephalus and malformations of the central nervous system. Fetal and neonatal pathology*. Springer-Verlag, USA, 2ª Ed., pp. 541-570.
- Lauwerys, R. (1992). *Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales*. Massons, España, Cap. **1**, pp. 175-201.
- Melton, D. & Hemmati-Brivantou, A. (1997). *Cell* **88**, 7-13.
- Mendenhall, W., Wackerly, D. & Scheaffer, R. (1994). *Estadística matemática con aplicaciones*. Grupo Editorial Iberoamericana, México, 2ª Ed., Cap. **10**, pp. 399-440.
- Montoya, A. (1997). *Toxicología clínica*. Méndez Editores, México, 2ª Ed., Cap. **17**, pp. 277-280.

- Moore, K. (1985). *Embriología básica*. McGraw-Hill Interamericana, México, 2ª Ed., Caps. 3, 17, pp. 24-49, 237-259.
- Moore, K. (1999). *Embriología clínica*. McGraw-Hill Interamericana, México, 6ª Ed., Cap. 18, pp. 486-493.
- Muñoz, H., Meneses-González, I. & Romieu, M. (1993). *Environ health* **48**, 132-139.
- Schnaas, L., Rothenberg, S. & Villanueva-Díaz, C. (1996). *Perinatol Reprod Hum* **10**, 155-168.
- Schnaas, L., Rothenberg, S. & Perroni, E. (1999). *Perinatol Reprod Hum* **13**, 214-220.
- Sirover, M. & Loeb, L. (1976). *Science* **194**, 1434-1436.
- Shukla, R., Bornschein, RL. & Dietrich, KN. (1989). *Pediatrics* **84**, 604-612.
- Tao, Y., Zhang, H. & Liu, J. (2001). *Wei Sheng Yan Jiu* **30**, 102-104.
- UBA – UMWELTBUNDESAMT (Editor) (1986): Handbuch Stoffdaten zur Störfall-Verordnung (Manual de datos sobre sustancias para la Ordenanza para casos de molestias). Berlín. (Materialien, 1/86).
- Varnagy, L., Budai, P. & Molnar, E. (1999). *Acta Veterinaria Hungarica* **48**, 113-124.
- Wasserman, G., Liu, X., Graziano, J. & Pine, D. (2001). *Neurotoxicol Teratol* **23**, 13-21.
- Wurst, W., Averbach, A. & Joyner A. (1994). *Development* **120**, 2065-2075.