



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN SUBAGUDA A PLOMO, SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR GLUCOCORTICOIDES EN BAZO Y TIMO DE RATA PREPÚBER

JUAN FRANCISCO GONZÁLEZ RIQUELME

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
y Animales

PROFESOR GUÍA: Dr. ANDREI TCHERNITCHIN V.

Financiamiento FONDECYT 1.950.634

**SANTIAGO, CHILE
2002**

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFECTO DE LA EXPOSICIÓN SUBAGUDA A PLOMO, SOBRE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR GLUCOCORTICOIDES EN BAZO Y TIMO DE RATA PREPÚBER

JUAN FRANCISCO GONZÁLEZ RIQUELME

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
y Animales

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ANDREI TCHERNITCHIN V.
PROFESOR CONSEJERO: NINA LAPIN.
PROFESOR CONSEJERO: GERMÁN FERRANDO.

SANTIAGO, CHILE
2002

AGRADECIMIENTOS:

MIS MÁS SINCEROS AGRADECIMIENTOS A LOS PROFESORES ANDREI TCHERNITCHIN Y NINA LAPIN, POR SU PREOCUPACIÓN, INCENTIVO Y BUENA DISPOSICIÓN EN TODO MOMENTO.

AL PROFESOR GERMÁN FERRANDO, POR SU EXCELENTE DISPOSICIÓN Y BUENA VOLUNTAD DEMOSTRADA.

A MI PADRE Y TÍA, POR SU PACIENCIA Y PREOCUPACIÓN.

A LOS AYUDANTES DE LABORATORIO, ALFREDO DÍAZ E IRIS RODRÍGUEZ, GRACIAS POR SU BUENA VOLUNTAD Y SENCILLEZ.

A LOS AMIGOS ARACELLY BÁEZ (MV), ANDREA CLAVERO (MV), RICARDO ALVAREZ (QF), DIEGO LASTRA (QF), ALBERTO ASPILCUETA (MV), VICTOR URIBARRI (MV), ALEX CIFUENTES Y JOSÉ LUIS BARRERA, POR EL APOYO LOGÍSTICO BRINDADO GENEROSAMENTE EN TODO MOMENTO.

AL PROFESOR FERNANDO NUÑEZ, POR SU APOYO DURANTE TODO SU PERÍODO COMO DIRECTOR DE ESCUELA DE PREGRADO EN LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS.

A TODOS AQUELLOS QUE ESPERARON DURANTE TIEMPO MI TITULACIÓN (PERDÓN POR LA OMISIÓN).

UNA DEDICACIÓN ESPECIAL A LOS QUE DESCANSANDO FINALMENTE, YA NO ESTÁN CON NOSOTROS, PERO VIVEN DIARAMENTE EN NUESTRAS MEMORIAS (Q.E.P.D):

JUAN ANIANO GONZÁLEZHERMANITO AL FIN CONCRETE UNO DE TUS DESEOS.

PROFESOR CÉSAR OROSTEGUI.....GRACIAS POR SU TIEMPO DEDICADO, SU SENCILLEZ Y SU DEDICACIÓN A LA DOCENCIA DESINTERESADAMENTE.

GLADYS RIQUELME CORTÉS.....DESCANSA EN PAZ MAMÁ.

ÍNDICE GENERAL:

Resumen	1
I. Introducción.	4
II.Revisión bibliográfica	
A. Cinética ambiental.....	7
B. Consideraciones farmacocinéticas.....	10
C. Consideraciones clínico-epidemiológicas relevantes.....	12
D. Efectos sobre el sistema nervioso central y sobre las vías de transducción de señales extracelulares.....	15
E. Plomo y radicales libres.....	19
F. Alteraciones génicas.....	20
G. Consecuencias cardiovasculares.....	20
H. Efectos endocrino-reproductivos.....	20
I. Alteraciones inmunológicas.....	22
J. Integración inmunoendocrina.....	26
K. Hormonas esteroidales y su efecto sobre el sistema inmune.....	27
L. Influencias del plomo sobre las catecolaminas y sobre las hormonas esteroidales.....	33
M. El rol inmunomodulador de los leucocitos eosinófilos.....	35
N. Mecanismos involucrados en la exocitosis de los gránulos del eosinófilo.....	36
O. Los eosinófilos ejercen sus efectos a través de la acción de sus gránulos.....	37
P. Evidencia de algunos cambios inducidos por plomo en la función y migración de los eosinófilos.....	38
III.Objetivos.....	39
IV.Material y método.	
A. Material.....	40
B. Método	
1. Diseño experimental.....	41
2. Procedimiento experimental.....	45
3. Procedimiento de evaluación.....	47
4. Análisis estadístico.....	48
V. Resultados.	

A. Número de eosinófilos en bazo.....	54
B. Número de eosinófilos en timo.....	56
C. Volumen y área de eosinófilos en bazo.....	58
D. Volumen y área de eosinófilos en timo.....	61
E. Número de linfocitos CD4 en timo.....	64
F. Número de linfocitos CD8 en timo.....	66
G. Número de linfocitos CD4 y CD8 en bazo.....	68
H. Número de marcas radioautográficas.....	68
VI.Discusión.	
A. Radioautografía.....	73
B. Inmunofluorescencia (población de linfocitos T <i>helper</i> y citotóxicos).....	73
C. Eosinofilia tisular y degranulación.....	78
VII.Conclusiones.....	
A. Radioautografía	
B. Inmunofluorescencia (población de linfocitos T <i>helper</i> y citotóxicos)	
C. Eosinofilia tisular y degranulación	
VIII.Bibliografía seleccionada.....	
	88

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS, FOTOGRAFÍAS y GRÁFICOS:

Fig. 1. Importancia del plomo atmosférico en la contaminación global del ambiente y en el aporte de plomo al organismo humano.....	7
Fig. 2. Vía de absorción, distribución y eliminación del plomo en el organismo humano.....	12
Tabla 1. Concentraciones sanguíneas de plomo en niños ariqueños de 5 a 8 años de edad.....	13
Tabla 2. Concentraciones sanguíneas de plomo en niños de Antofagasta.....	14
Tabla 3. Grupos de ratas usadas para la determinación del número de eosinófilos con sus respectivos pretratamientos (día 7 al 19) y tratamientos (día 21).....	42
Tabla 4. Grupo de ratas con sus respectivos pretratamientos y tratamientos, usados para la cuantificación del grado de degranulación de eosinófilos.....	42
Tabla 5. Grupo de ratas con sus respectivos pretratamientos y tratamientos, destinados a cuantificar el cambio en el número de linfocitos T CD4 y CD8.....	43
Tabla 6. Grupo de animales usados para la determinación semicuantitativa del número de receptores para glucocorticoides.....	44
Fotografía 1. Eosinófilos de bazo degranulados, demostrado por la escasa cantidad de gránulos fluorescentes. 40X. Microscopio epifluorescente.....	50
Fotografía 2. Eosinófilos con escasa cantidad de gránulos, alrededor de un sinusoide esplénico.	50
Fotografía 3. Eosinófilos tímicos agrupados, medianamente granulados.....	50
Fotografía 4. Eosinófilos de bazo intensamente granulados.....	50
Fotografía 5. Eosinófilo tímico aislado. Se observa la presencia de abundantes gránulos densamente fluorescentes alrededor de un núcleo excéntrico y libre de fluorescencia.....	51
Fotografía 6. Apariencia de la región corticomédular de timo. 10X. MF.....	51
Fotografía 7. Vista panorámica (20X) mostrando la presencia de abundantes	

linfocitos en timo de rata prepúber, producto de la unión con anticuerpos fluorescentes.....	51
Fotografía 8. Imágen computacional de un eosinófilo aislado, fotografiado y sometido a morfometría computarizada.....	52
Fotografía 9. Imágenes del eosinófilo mostrado en la fotografía anterior, demostrando el procesamiento realizado.....	52
Fotografía 10. El color verde corresponde a los gránulos con mayor contenido de proteínas que fluorescen con la eosina y el azul de anilina.....	52
Fotografía 11. Fotografía correspondiente a la pantalla del computador, mostrando la imágen final seleccionada por el operador	52
Fotografía 12. Linfocitos T CD4 (<i>helper</i>) fluorescentes detectados por anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína.....	53
Fotografía 13. Escasa cantidad de linfocitos T CD4 (<i>helper</i>) ubicados en timo de ratas impúberes expuestas a plomo.....	53
Fotografías 14 y 15. Eosinófilos de bazo mostrando una distribución perisinusoidal y moderada a leve intensidad luminosa.....	69
Fotografías 16 y 17. Eosinófilos esplénicos de ratas del grupo control (expuestas y tratadas con suero fisiológico).	69
Fotografías 18 y 19. Eosinófilos esplénicos intensamente fluorescentes, demostrando una gran cantidad de gránulos.....	70
Fotografías 20 y 21. Cortes de timo, mostrando la apariencia frecuentemente observada de eosinófilos tímicos (20 X).....	70
Fotografía 22. Conglomerado de eosinófilos esplénicos medianamente granulares. (40 X).....	71
Fotografía 23. Eosinófilos de bazo con abundante cantidad de gránulos intracitoplasmáticos muy fluorescentes. (40 X).....	71
Fotografía 24. Eosinófilos de timo, pequeños y moderadamente granulares (40 X).....	71
Fotografía 25. Pequeños eosinófilos brillantes y compactos en corteza de timo (aparencia usual) (40 X).....	71
Fotografía 26. Ampliación correspondiente a corte histológico de bazo, mostrando la numerosa presencia de receptores para glucocorticoides.....	72

Gráfico 1. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona sobre el número total de eosinofilos esplénicos en ratas impúberes.....	55
Gráfico 2. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona sobre el número total de eosinofilos tímicos en ratas impúberes.....	57
Gráfico 3. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona sobre el volumen de eosinófilos esplénicos en ratas impúberes.....	59
Gráfico 4. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona, sobre la densidad ocupada por gránulos menos luminosos en leucocitos eosinófilos esplénicos de ratas impúberes.....	60
Gráfico 5. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona sobre el volumen de eosinófilos tímicos en ratas impúberes.....	62
Gráfico 6. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona, sobre la densidad ocupada por gránulos menos luminosos en leucocitos eosinófilos tímicos de ratas impúberes.....	63
Gráfico 7. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona, sobre el número total de linfocitos T CD4 presentes en timo de ratas impúberes.....	65
Gráfico 8. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona, sobre el número total de linfocitos T CD8 presentes en timo de ratas impúberes.....	67

ABREVIACIONES USADAS:

1,25 (OH)₂D₃: vitamina D₃.
AAL-D: ácido delta-aminolevulínico.
AAL-S: ácido gama-aminolevulínico.
AC: adenilato ciclasa.
ACTH: adrenocorticotrofina.
AMPc: monofosfato de adenosina.
ATP: trifosfato de adenosina.
CD3+: molécula asociada al receptor de células T (TCR).
CGi-PDE: fosfodiesterasa inhibida por monofosfato de guanosina.
CRH: hormona liberadora de corticotrofina.
CSF-1: factor estimulador de colonias.
DAG: diacilglicerol.
DBD: dominio captador de DNA.
DEG: degranulación.
DHEAS: sulfato de dehidroepiandrosterona.
DNA: ácido desoxiribonucleico.
Dx-T: dexametasona tritiada.
ECP: proteína catiónica del eosinófilo.
EDN: neurotoxina derivada de eosinófilos (EPX).
EOS: eosinófilo.
EPO: enzima peróxidasa.
ERK: quinasa extracelularmente regulada, llamada también quinasa de MAP (MAPK).
FC: fracción cristalizable de inmunoglobulina.
FSH: hormona estimulante de los folículos.
GC: glucocorticoides.
GH: hormona del crecimiento.
GM-CSF: factor estimulante de colonias granulocíticas-macrofágicas.
GMPc: monofosfato cíclico de guanina.
GRF: factor liberador de la hormona del crecimiento.
H₂O₂: peróxido de hidrógeno.
HC: hidrocortisona.
HLA: antígeno de histocompatibilidad.
HPA: eje hipotalámico-pituitario-adrenal.
HRE: elemento de respuesta hormonal.
HSP: proteína de choque térmico.
ICAM-1: molécula de adhesión intracelular.
IF: inmunofluorescencia indirecta.
IFN: interferón.
IgE: inmunoglobulina E.
IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina.
IgG: inmunoglobulina G.
IL1-10: interleucina 1 al 10.
IP₂₋₃: bi(tri)fosfato de inositol.
IP3: trifosfato de fosoinositol.
JAK-2: quinasa Janus-2.
Kinasa-CAM: quinasa dependiente de calmodulina-calcio.
LH: hormona luteinizante.
LHRH: factor liberador de LH.
Linfocitos CD4+: linfocitos T *helper* (auxiliares).
Linfocitos CD8+: linfocitos T citotóxico.

LPS: lipopolisacarido.
LTB4: leucotrieno B4.
LTC4: leucotrieno C4.
LTD4: leucotrieno D4.
MAPK: proteína quinasa asociada a mitógenos.
MBP: proteína mayor básica.
MEK: quinasa mitógeno-activada, llamada también quinasa activante de ERK (MAPK).
MF: microscopio de epifluorescencia.
NAD/NADH: nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado/reducido (H).
NC: nucleótidos cíclicos.
NE: norepinefrina.
NK: células *natural killers*.
NMDA: N-metil-D-aspartato.
NO: óxido nítrico.
O₂⁻: anión superóxido.
OH: radical hidróxilo.
OT: oxitocina.
PAF: factor de activación plaquetario.
Pb: plomo.
PBS: solución de *buffer* fosfato.
PDE-CAM: fosfodiesterasa dependiente de calmodulina-calcio.
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc.
PKC: proteína quinasa C.
PLC: fosfolipasa.
PMN: polimorfonucleares.
POMC: proopiomelanocortina.
PRL: prolactina
R: receptor hormonal.
RANTES: factor regulado en linfocitos T activados, normalmente expresado y secretado.
RCN: receptor citosólico-nuclear.
RNA: ácido ribonucleico.
RNAm: RNA mensajero.
ROS: especies reactivas derivados del oxígeno.
S: solución salina.
SF: suero fisiológico.
SH-2: proteína quinasa homóloga a *src*.
SNC: sistema nervioso central.
STATs: factores transductores de señales y activadores de la transcripción.
T₃: triyodotiroxina.
T₄: tiroxina.
TAT: tirosina-aminotransferasa.
TCR: receptor de células T.
Th1: linfocito T *helper* (auxiliar) tipo 1.
Th2: linfocito T *helper* (auxiliar) tipo 2.
TNF: factor de necrosis tumoral.
TRH: hormona liberadora de tirotrófina.
TYK: tirosina-quinasa.
VLA-4: antígeno de presentación tardía.
ZAP-70: proteína-70 KDa asociada a la cadena CD3- ζ .

RESUMEN:

Los efectos de la exposición a bajos niveles de plomo sobre la función endocrina e inmune, no han sido objeto de suficientes estudios, siendo esta situación diferente en el caso de la intoxicación aguda, particularmente en otros sistemas corporales, tales como el nervioso, cardiovascular, reproductivo y gastrointestinal.

La presente investigación estudió los efectos de la exposición subaguda a bajos niveles de plomo en el periodo prepuberal, sobre algunos parámetros conocidos que evalúan, en alguna medida, los mecanismos de adaptación inmunoendocrinos frente al *stress*, considerándose en este estudio, el número de linfocitos T CD4+ y CD8+, número y grado de degranulación de leucocitos eosinófilos y número de receptores para glucocorticoides presentes en timo y bazo de las ratas impúberes analizadas.

Ratas Sprague Dowley hembras, mantenidas bajo condiciones de manejo con 12 h de luz y acceso libre a alimento y agua, fueron expuestas a acetato de plomo o suero fisiológico, vía inyecciones subcutáneas sucesivas, alternadas cada 72 h, a partir de los 7 días de edad hasta alcanzar los 19 días, momento en el cual cada animal tratado con plomo recibió una dosis total acumulada de 24.38 mg., distribuida en forma de dosis crecientes, proporcionales al peso de los animales. Después de 48 h de la última dosis de suero fisiológico o acetato de plomo, se aplicó una inyección endovenosa única de suero fisiológico o 18 mg de succinato de hidrocortisona por cada 100 g de peso corporal y 24 h después se anestesió a los animales con gas éter, extrayendo muestra completa de timo y bazo, seleccionando tejido para fijación en formalina al 10%, deshidratación e inclusión en parafina, para luego realizar cortes histológicos seriados, sometiéndolos a tinción con azul de anilina y eosina, para la determinación, bajo microcopía de epifluorescencia, del número y grado de degranulación de eosinófilos. Adicionalmente, se dispusieron cortes para desparafinación y posterior incubación con anticuerpos monoclonales marcados con

ficoeritrina o fluoresceína, siendo destinados una primera serie de cortes a reaccionar con los anticuerpos anti-CD8, procediendo en una segunda serie, a la incubación de los cortes con anticuerpos anti-CD4.

Paralelamente, se tomaron muestras de bazo y timo de ratas sometidas a inyecciones de plomo o suero fisiológico entre los días 7 y 19 de edad, aplicando intravenosamente suero fisiológico en ambos grupos el día 21, procediendo 24 hrs. después a la recolección de pequeñas muestras de tejido, incubándolas *in vitro* con dexametasona tritiada, congelando posteriormente los tejidos radiomarcados en propano/butano líquido enfriado en nitrógeno líquido, para luego someter las muestras a la técnica de radioautografía seca, destinada a cuantificar, bajo microscopía óptica, los receptores para glucocorticoides presentes en timo y bazo.

Los resultados mostraron una disminución inducida por plomo del número de linfocitos T CD4+ y CD8+ en timo de ratas expuestas a plomo durante la vida prepuberal, encontrándose además un reducido número de linfocitos CD8+ en los grupos tratados con hidrocortisona.

El número de receptores para glucocorticoides no demostró variación estadísticamente significativa atribuible al efecto del plomo en el presente estudio experimental.

Los animales expuestos a plomo demostraron una disminución en el número de eosinófilos en timo, pero no en bazo. Además, presentaron una disminución inducida por hidrocortisona en el número de eosinófilos en bazo, pero no en timo. Se comprobó un efecto sinérgico entre el plomo y la hidrocortisona, demostrado por el disminuido número de eosinófilos esplénicos en los animales que recibieron plomo y luego fueron tratados con hidrocortisona.

Los leucocitos eosinófilos esplénicos se degranulan con mayor intensidad en los animales expuestos a plomo, observándose una reversión de este fenómeno inducido por hidrocortisona, revelada por una menor degranulación en el grupo expuesto a plomo y tratado con hidrocortisona en relación a los animales expuestos a plomo y tratados posteriormente con suero fisiológico.

El grado de degranulación de los eosinófilos tímicos, no demostró diferencias significativas producto de algún tratamiento. No obstante, los eosinófilos de timo fueron de menor volumen y de mayor luminosidad que los encontrados en todas las muestras de bazo.

Luego del análisis de los resultados es posible afirmar que la exposición subaguda a plomo en ratas a edad prepuberal, modifica variablemente el número de linfocitos T en órganos linfoides, alterando paralelamente la eosinofilia tisular y el grado de degranulación de los leucocitos eosinófilos, sin cambios aparentes en el número de receptores para glucocorticoides analizados en bazo y timo.

I. INTRODUCCIÓN:

El plomo es un metal innecesario para el organismo, por tanto, la presencia de cualquier nivel de plomo en el medio corporal interno no es natural y refleja contaminación.

En los EEUU, la contaminación con plomo fue favorecida principalmente a través de las emisiones vehiculares y de pinturas que contenían plomo, provenientes de viviendas en deterioro. En los años setenta, la intoxicación con plomo fue una importante causa de enfermedad, particularmente en niños de diversas ciudades, siendo la encefalopatía por plomo relativamente frecuente. Sin embargo, la situación ha cambiado profundamente debido a la progresiva disminución de plomo en la gasolina (Piomelli, 1996). El plomo es un agente que sufre bioacumulación progresiva, lo que condiciona que el cuadro clínico de intoxicación plúmbica sea en la mayoría de los casos de instalación lenta, provocando lo que se ha denominado tradicionalmente como toxicidad crónica por plomo (Corey y Galvao, 1989).

Los efectos de los bajos niveles de plomo sobre el cerebro, riñón, médula ósea, sistema cardiovascular, inmune, endocrino y reproductivo no han sido objeto de suficiente investigación. A pesar de esto, minuciosos estudios han demostrado que la absorción en la edad preescolar de bajas concentraciones de plomo, en forma progresiva, causa anormalidades neuropsicológicas, incluyendo bajo nivel de coeficiente intelectual y pobre rendimiento escolar (Needleman, 1990). Estos fenómenos son explicados, por algunos autores, a través de lo que se ha denominado *imprinting* o fijación de nuevas vías de diferenciación celular (heterodiferenciación), causando modificaciones permanentes en la actividad de los receptores hormonales y en la intensidad de las respuestas mediadas por ellos (Tchernitchin y Tchernitchin, 1992). Sólo recientemente se ha demostrado en trabajadores expuestos ocupacionalmente a cantidades bajas de plomo, una disminución en la actividad de

leucocitos neutrófilos, alterados principalmente en su función de quimiotaxis, fagocitosis y formación de superóxidos (Valentino y col., 1991); señalándose que los efectos inmunosupresivos de bajos niveles de plomo, pueden ser un indicador sensible de la exposición a este metal. No obstante, es posible proyectar los efectos del plomo sobre leucocitos presentes en órganos linfoides como ganglios, timo y bazo. Fischbein y col. (1993), detectaron en trabajadores expuestos a plomo, una importante disminución en el número y porcentaje absoluto de linfocitos T CD3 y CD4, demostrando además una inadecuada respuesta linfocitaria a mitógenos. En efecto, la exposición a plomo disminuye significativamente la respuesta mitogénica linfocitaria, pero no tiene efectos funcionalmente relevantes, sobre los títulos de anticuerpos circulantes (Redig y col., 1991).

Los efectos descritos para el plomo semejan, en alguna medida, a los conocidos cambios sobre la función inmunológica producidos por la acción de los glucocorticoides (GC). Estos tienen efectos sobre macrófagos y neutrófilos, estabilizan los lisosomas de macrófagos, reduciendo su capacidad para liberar enzimas hidrolíticas, deprimiendo el metabolismo oxidativo, disminuyendo su capacidad fagocitaria. La respuesta proliferativa linfocitaria es suprimida por GC, disminuyendo la respuesta a mitógenos, suprimiendo la síntesis de linfoquinas y el reconocimiento de antígenos, además de disminuir la actividad citotóxica (Papich y Davis, 1989). Complementariamente, los glucocorticoides inducen una migración de eosinófilos a ganglios linfáticos, timo y bazo, los que al liberar las proteínas EPX y ECP, se ha propuesto que determinan una disminución en el número de linfocitos en los órganos linfoides. Este proceso fue descrito como inmunoregulación dependiente de eosinófilos (Tchernitchin y col., 1990).

Basados en la evidencia existente, es posible establecer un paralelismo entre el plomo y los glucocorticoides, en cuanto a los variados efectos depresores sobre el sistema inmune, existiendo probablemente para el plomo, mecanismos similares pero bioquímicamente independientes a los descritos para los glucocorticoides, fenómeno que podría tener similitud con una sinergia de adición, demostrado por la compartida actividad supresora sobre linfocitos B y subpoblaciones de células T, reducida

proliferación celular de linfocitos T y disminución de la acción lisosomal en macrófagos. No obstante, es posible que este metal pesado actúe alterando la función o estructura de diversas proteínas con actividad enzimática contenida en los gránulos de los eosinófilos, desregulando la inmunomodulación propuesta para los leucocitos eosinófilos. Las consecuencias de la exposición a plomo sobre linfocitos y eosinófilos, pueden corresponder alternativamente a un fenómeno de sinergia de potenciación, explicado en alguna medida, por la posible facilitación provocada por el plomo, en el reciclaje y reutilización dependiente de energía, del receptor para glucocorticoides en estas células (Ortí y col., 1992). El fenómeno opuesto podría evidenciarse, demostrado por la inhibición por concentraciones micromolares de plomo, de todos los tipos de proteinquinasa-C (Sun y col., 1999), enzima encargada de la fosforilación de proteínas con acción enzimática, alterando de esta forma diversas acciones intracelulares dependientes de energía.

Este trabajo forma parte de un proyecto más amplio, en el cual se investiga el efecto de la exposición aguda, subaguda y prenatal a plomo, sobre las respuestas biológicas inducidas por los estrógenos en útero y sobre los cambios provocados por los glucocorticoides en órganos linfoides.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

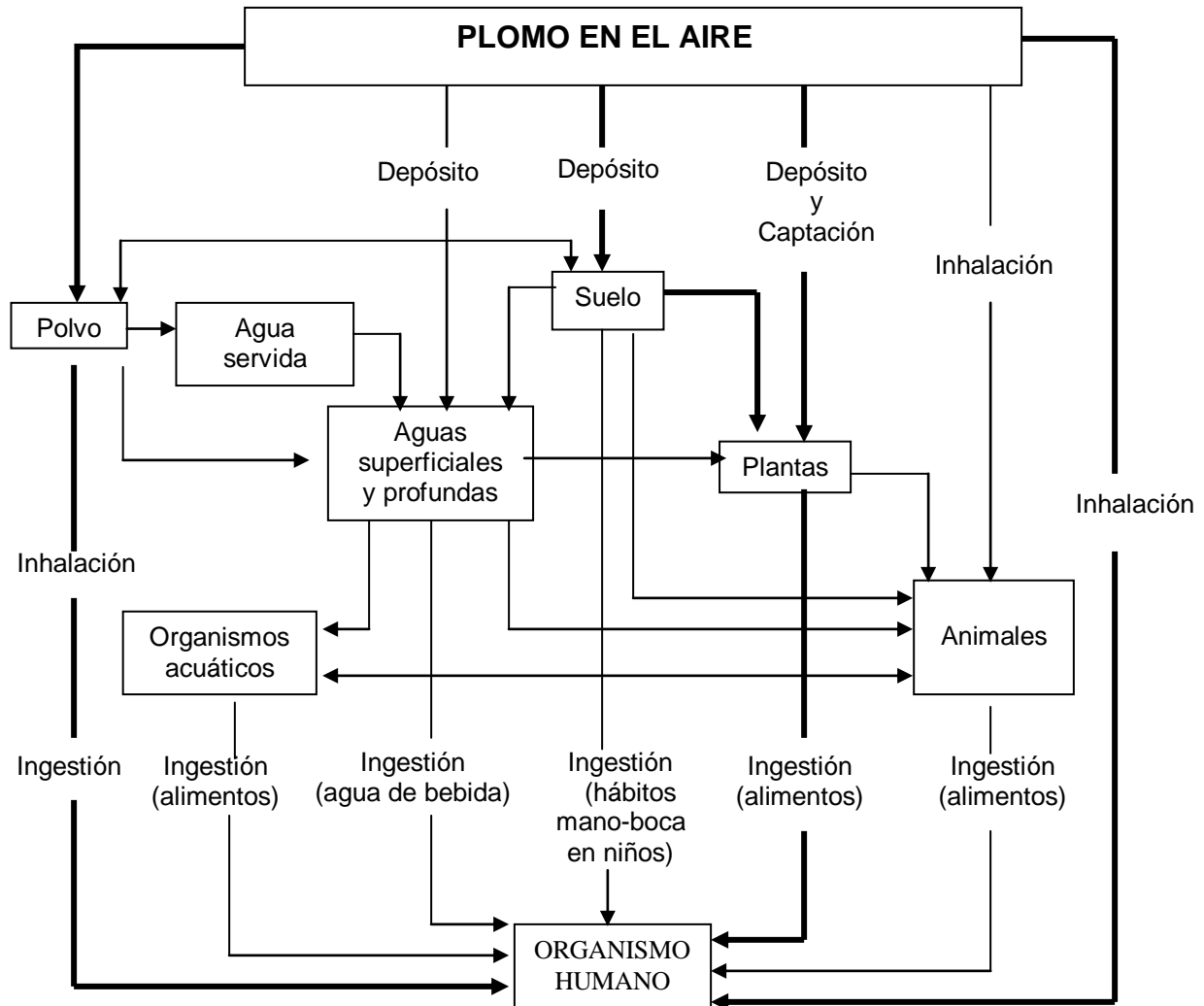
A. CINÉTICA AMBIENTAL:

Individuos expuestos a plomo en muy pequeñas cantidades tienen niveles sanguíneos menores a 3 $\mu\text{g/dL}$, observándose que la exposición crónica a plomo produce un progresivo incremento de los niveles en la sangre. Si bien, hemos adoptado el término “intoxicación plúmbica”, en la práctica ha sido difícil acordar un nivel umbral bajo el cual no existan efectos adversos, del punto de vista fisiológico. En 1991, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, USA), definió que todos los niños con niveles de plomo sanguíneo de 10 $\mu\text{g/dL}$ o más, presentan efectos nocivos para su salud (Piomelli, 1996).

El plomo se encuentra en forma natural en el medio ambiente, siendo su concentración en la corteza terrestre de 13 mg/kg aproximadamente, estimándose en zonas remotas de los océanos y en Groenlandia, un nivel natural de 0.0001 a 0.001 $\mu\text{g/m}^3$ (Chow y Bennet, 1969), fluctuando su concentración en aguas superficiales de algunos océanos entre 0.05 y 0.4 $\mu\text{g/L}$ (Needleman, 1990). Concentraciones típicas de plomo en suelos no contaminados, fluctúan entre 10 a 50 *ppm*, aumentando los niveles en 10 a 200 veces más, debido a la actividad humana, llegando a 60.000 *ppm* en terrenos aledaños a calderas de fundiciones (OPS-OMS, 1979) (figura 1).

Al referirse a las fuentes de contaminación en el ambiente ocupacional (laboral), es importante señalar que estas fuentes son además responsables, en gran medida, de la exposición a la que está sometida la población general. Además, los individuos que están expuestos laboralmente, pueden a través del plomo presente en sus ropas, representar una fuente de contaminación importante para su hogar, afectando principalmente a los niños, que presentan una mayor susceptibilidad a la intoxicación (Corey y Galvao, 1989).

FIGURA 1. IMPORTANCIA DEL PLOMO ATMOSFERICO EN LA CONTAMINACIÓN GLOBAL DEL AMBIENTE Y EN EL APOORTE DE PLOMO AL ORGANISMO HUMANO.



FUENTE: Adaptado de Publicación Científica N° 388 de OPS, Criterios de Salud Ambiental 3, Plomo. 1979

En adición a las clásicas fuentes de plomo, como son las emisiones provenientes de algunas industrias y de gasolinas plomadas, en conjunto con las pinturas de muros deteriorados que producen polvo con alta concentración de plomo, es posible constatar como fuentes de alguna importancia, los utensilios de cocina que contienen soldaduras plomadas, los utensilios de alfarería usados para cocinar y

almacenar alimentos, los recipientes de cerámica inadecuadamente vitrificados o barnizados, el consumo de mariscos y cereales provenientes de áreas altamente contaminadas, el uso de baterías desechadas y algunos cosméticos. Además, el cigarro constituye una fuente de plomo. Fumar unos 20 cigarros diarios equivalen entre 1 a 5 μg de plomo (Corey y Galvao, 1989).

La adición de sales de plomo a las pinturas como agentes colorantes y estabilizantes, es una importante causa de saturnismo infantil, en especial si estas pinturas están en deterioro, eliminando polvo que ingresa al organismo por vía respiratoria y oral, a través de la costumbre de llevarse las manos a la boca (actividad mano-boca) (Piomelli, 1996).

En los animales silvestres, principalmente las aves, los perdigones representan un peligro de intoxicación aguda, muriendo cada año más de un millón de aves acuáticas producto de la ingestión de perdigones (Poppenga, 1994).

Un estudio orientado a la detección de plomo en canales frescas de matadero tomadas al azar, encontró concentraciones promedios de plomo de 1.02 *ppm* en hígado de aves, 1.04 *ppm* en hígado de vacuno, 1.02 *ppm* en riñones de vacuno, 0.73 *ppm* en hígado de cerdo y 0.85 *ppm* en riñones de esta última especie (Booth, 1987).

El envenenamiento de animales puede ser consecuencia de la curiosidad propia, al ingerir pinturas plomadas viejas y secas, o pintura de envases vacíos, masilla de vidriería, aceite de motor, linóleo, gasolina plomada, soldaduras, asfalto, hierba próxima a carreteras con circulación vehicular intensa, agua procedente de tuberías de plomo o botes estañados con plomo (Hatch, 1987).

La declinación en el promedio de plomo sanguíneo ha disminuido la frecuencia y severidad de signos clínicos atribuibles a intoxicación plúmbica en países desarrollados, producto de programas de control estatal que han reducido principalmente la cantidad de plomo presente en el aire ambiental urbano, a través del equipamiento con filtros catalíticos en los automóviles, los cuales no pueden usar

gasolina que contenga derivados alquílicos de plomo (Needleman, 1990; Piomelli, 1996).

B. CONSIDERACIONES FARMACOCINÉTICAS:

El plomo es absorbido por inhalación, ingestión y también, en el caso de los derivados alquílicos de plomo adicionados a la gasolina, a través de la piel. La vía de ingreso, el tamaño de partícula y el tipo de compuesto plomado (orgánico o inorgánico), determinan la concentración y la posibilidad de difusión en el organismo (Corey y Galvao, 1989). Un 35% del plomo inhalado se deposita en la nasofaringe, árbol traqueobronquial y alvéolo, ingresando posteriormente al tracto gastrointestinal luego de deglutir las partículas ascendidas por el aclaramiento ciliar normal. Las partículas con menos de $0.1 \mu\text{m}$ presentes en las vías respiratorias terminales, se absorben rápida y completamente, constituyendo entre un 35 a 50% del plomo que alcanza el tracto respiratorio inferior, estimándose que una concentración de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de plomo en el aire inhalado, determina una concentración de 1 a $2 \mu\text{g}/\text{dL}$ en la sangre (Corey y Galvao, 1989).

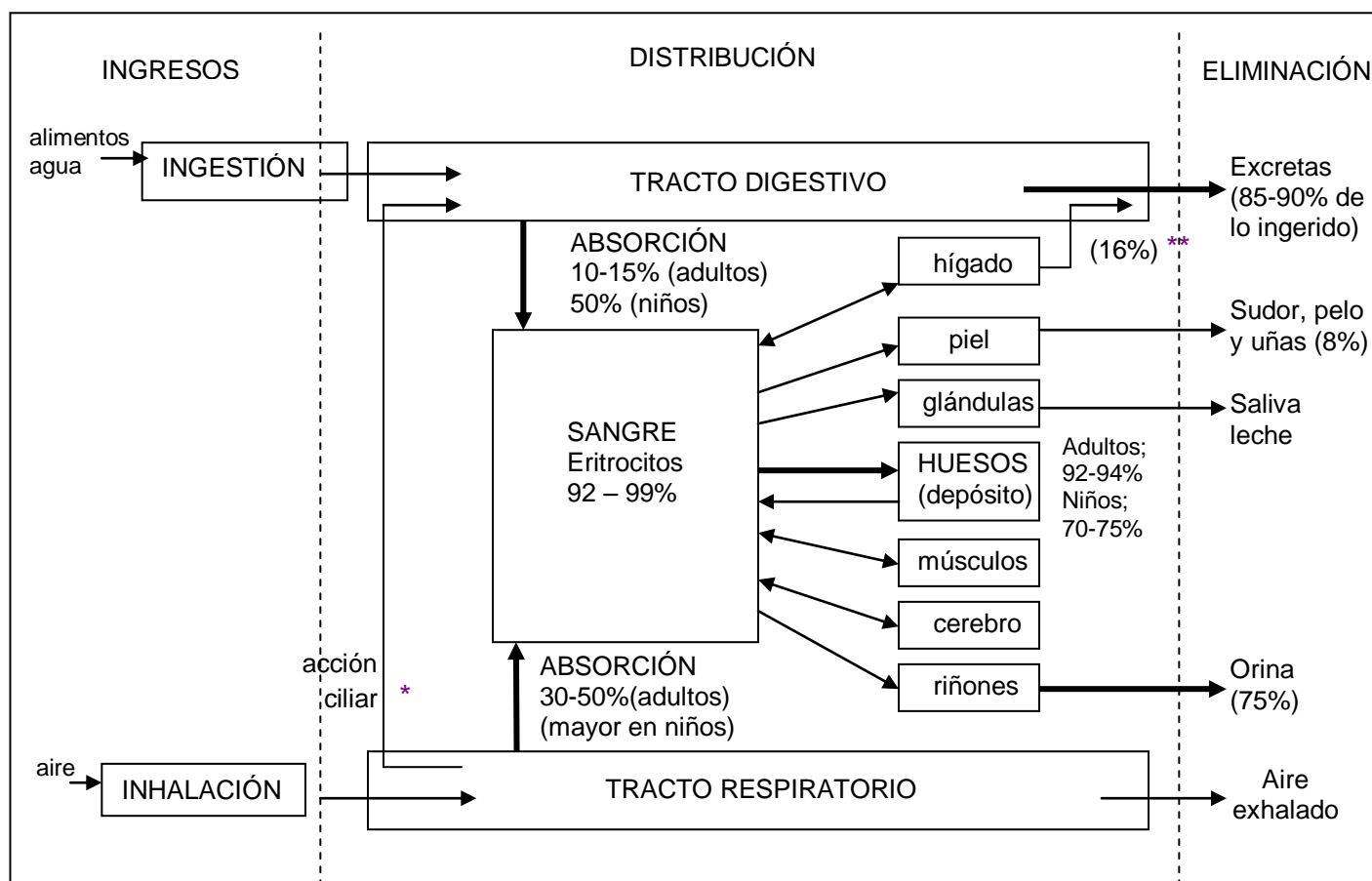
La tasa de absorción gastrointestinal es independiente de la forma química del compuesto plomado, siendo en niños de orden del 50% y en los adultos de un 10 a 15%, incrementándose tanto en adultos como en niños debido a una dieta pobre en calcio, hierro y proteínas (OPS-OMS, 1979; Hu, 1997). Luego de la absorción en el intestino y tracto respiratorio, una elevada proporción es transportada por la membrana de los eritrocitos (95%), uniéndose el resto a la albúmina del suero, quedando menos del 1% libre y disponible para la distribución hacia los distintos tejidos. Al llegar a la circulación portal, una buena parte se une a las mitocondrias de los hepatocitos, para luego excretarse por la bilis, eliminándose finalmente por tracto digestivo o eventualmente realizando una circulación enterohepática (Hatch, 1987; Hu, 1997). El plomo orgánico absorbido (tetraetil-tetrametil plomo) es lipofílico y por tanto fácilmente absorbido por la piel, pulmón y tracto gastrointestinal, siendo convertido en hígado a plomo inorgánico y trietil plomo, el cual es el mayor

responsable de los efectos neurotóxicos observados luego de la exposición a gasolinas (Klaassen, 2001).

La eliminación del plomo ingerido se hace principalmente a través de las heces, en cambio un 75% del plomo absorbido por inhalación se elimina a través de filtración renal, acumulándose concentraciones importantes sobre los epitelios tubulares, lugar donde se forman inclusiones de proteinato de plomo, disminuyendo de esta forma la función renal progresivamente (Hatch, 1987; Smith y col., 1998). Adicionalmente, el plomo libre puede ser excretado con la leche en concentraciones peligrosas para los lactantes, siendo capaz de atravesar, tanto la barrera hematoencefálica, como la placentaria, asociándose niveles por sobre 10 $\mu\text{g/dL}$ en el cordón umbilical, con disminución en el coeficiente intelectual en los primeros dos años de vida posnatal (Rothemberg y col., 1989; Needleman, 1990).

Cuando la sangre fluye a través de los huesos, el plomo sin fijar (libre), se une a la sustancia ósea, especialmente a las regiones en crecimiento, concentrando los huesos más del 90% de la carga total del organismo. La captación de plomo por los huesos supone una redistribución desde los tejidos blandos, siendo el fósforo capaz de promover el almacenamiento de plomo en los huesos, observándose el fenómeno contrario en el hiperparatiroidismo secundario, produciendo mayor disponibilidad de plomo circulante (Hatch, 1987; Corey y Galvao, 1989; Guilarte, 1997). Se describen tres compartimientos de almacenamiento para el plomo: un compartimiento rápido, sanguíneo, con una vida media de alrededor de 27 días; un compartimiento más lento, constituido por tejido blando, con una vida media de 30 días; y un compartimiento de reserva a largo plazo, representado primariamente por tejido óseo, con alrededor de 27.8 años de vida media (Corey y Galvao, 1989) (figura 2).

FIGURA 2: VÍA DE ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN Y ELIMINACIÓN DEL PLOMO EN EL ORGANISMO HUMANO



* Puede deglutirse hasta un 40% del plomo inhalado como partículas de diámetro mayor.

** Implica secreciones gastrointestinales, que incluyen la bilis.

C. ANTECEDENTES CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS RELEVANTES:

Debido a la afinidad del plomo por los grupos sulfidrilos, fosfatos y otros ligandos, es capaz de cambiar la configuración de enzimas tales como la deshidratasa del ácido delta-aminolevulínico (AAL-D), participante en la síntesis del grupo *hemo*, o la

ferroquelatasa, enzima necesaria para la adecuada captación de fierro por los precursores de los eritrocitos (Corey y Galvao, 1989; Needleman, 1990). Otros mecanismos de interferencia la constituyen la alteración (inhibición y estimulación) de la sintetasa del ácido gama-aminolevulínico (AAL-S), la inhibición de la hemosintetasa y la inhibición de las enzimas participantes en la transformación del coproporfirinógeno III en protoporfirina IX. Estas alteraciones tiene lugar en la médula ósea, observándose en el suero un aumento del contenido de AAL, fierro y porfirinas.

La determinación de la concentración del AAL en orina o la concentración de coproporfirinas urinarias, son métodos válidos pero con sensibilidad limitada a valores por sobre los 40 $\mu\text{g/dL}$, siendo la determinación de la AAL-D eritrocitaria el método más indicado para el diagnóstico precoz ($> 10 \mu\text{g/dL}$), reflejando exposiciones crónicas, aunque ineficiente para niveles superiores a 60 $\mu\text{g/dL}$ (intoxicación clínica) (Corey y Galvao, 1989; Piomelli, 1996; Hu, 1997). La exposición a plomo durante varios meses reflejada por plumbémias sostenidas de al menos 25 $\mu\text{g/dL}$, aumentarán los niveles de zinc-protoporfirinas medidas en sangre, constituyendo un común efecto indicador de exposición.

Según valores entregados por la III reunión de la Comisión Nacional para la Vigilancia de la Salud y Nutrición de los EEUU, la concentración de plomo en la población general disminuyó desde 12.2 $\mu\text{g/dL}$ en 1980 a 3.2 $\mu\text{g/dL}$ en 1991, con niveles de 20 $\mu\text{g/dL}$ o más presentes en sólo un 1.1% de los niños en la población total (Piomelli, 1996). En Chile, estudios recientes en la ciudad de Arica, en la Villa Santa María, construída sobre antiguos acopios de plomo, demostraron niveles de plomo sanguíneos en niños entre 5 a 8 años de edad, sobre los 20 $\mu\text{g/dL}$ en el 36% de las muestras analizadas (tabla 1).

%DE LA POBLACIÓN	PLOMO SANGUÍNEO $\mu\text{g/dL}$
20	1-9,9
44	10-19,9
32	20-29,9
4	30-39,9

--	--

TABLA 1. Concentraciones sanguíneas de plomo en niños ariqueños de 5 a 8 años de edad (publicación del Colegio Médico de Chile, en preparación, 1999).

Adicionalmente, se encontraron significativos niveles de plomo en niños menores de 8 años, que viven en zonas cercanas a lugares de acopios de plomo en la ciudad chilena de Antofagasta (tabla 2).

%DE LA POBLACION	PLOMO SANGUINEO μg/dL
10	1-9,9
35	10-19,9
34	20-29,9
14	30-39,9
7	40-49,9

TABLA 2. Concentraciones sanguíneas de plomo en niños chilenos de Antofagasta (publicación en preparación del Colegio Médico de Chile, 1998).

El plomo parece tener efectos bioquímicos y funcionales adversos en casi todos los tejidos y órganos de mamíferos, siendo predominantes los signos encefálicos y gastrointestinales en la intoxicación aguda. No obstante, la exposición crónica constituye la situación más frecuente y de mayor importancia epidemiológica (Hatch, 1987; Corey y Galvao, 1989), produciéndose por concentraciones relativamente bajas de plomo en el ambiente o causados por fuentes ambientales atípicas, bajo un proceso de exposición mantenida y a largo plazo, presentándose de preferencia en la población general (además de la ocupacionalmente expuesta), demostrando ser el daño neuropsicológico en niños, un ejemplo clásico descrito ya en el año 1943, reportándose una alta incidencia de trastornos del aprendizaje y problemas de comportamiento en niños recuperados de plumbismo agudo (Rothemberg y col., 1989; Needleman, 1990).

De manera general, podría atribuirse al plomo un *imprinting* bioquímico/hormonal en la etapa prepuberal. El *imprinting*, como mecanismo

responsable, significa una alteración persistente para toda la vida en la diferenciación de algunos tipos celulares, manifestado como cambios en la cantidad y calidad de los receptores (R) hormonales en las células afectadas; cambios bioquímicos, morfológicos y funcionales provocados por contaminantes, fármacos, hormonas y otros agentes que pueden interactuar con los diferentes tipos celulares en distintas etapas del desarrollo fetal o posnatal temprano (Csaba, 1986; Tchernitchin y Tchernitchin, 1992); fenómeno similar a los estudios que reportan una reducción en los R para gonadotrofinas ováricas junto a una disminuída conversión de progesterona a androstenediona y dihidrotestosterona en ratas adultas expuestas a plomo en su vida prenatal y prepuberal (Wiebe, 1988); o una alterada afinidad de R opióides en cerebro de ratas tratadas con plomo durante su vida prenatal, señalando adicionalmente que la exposición a plomo perinatalmente afecta el número y concentración del R para estrógenos en útero (Tchernitchin y Tchernitchin, 1992).

D. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y SOBRE LAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EXTRACELULARES:

La exposición prolongada a niveles bajos de plomo, produce efectos importantes en el sistema nervioso central, cambios en la permeabilidad capilar, en el desarrollo neuronal, la mielinización y el metabolismo de las catecolaminas. Recientemente, Dyatlov y col. (1998), describieron la capacidad del plomo para potenciar irreversiblemente la penetración del glutamato plasmático a través de la barrera hematoencefálica, causando una incrementada disrupción de esta barrera.

Trabajos orientados a dilucidar los mecanismos que producen neurotoxicidad inducida por la exposición prenatal a bajos niveles de plomo en niños, revelaron una correlación negativa entre la concentración de metabolitos de la serotonina y dopamina, y la coordinación y sociabilidad presentada a los 9 meses de edad, demostrando con ello un efecto directo sobre el desarrollo del sistema serotoninérgico principalmente (Tang y col., 1999). El subtipo de receptor para N-metil-D-aspartato (NMDA), aminoácido excitatorio del SNC, ha sido foco de una intensa investigación durante la década pasada, debido al rol mostrado en el desarrollo cerebral, la

plasticidad neuronal y las condiciones patológicas asociadas con excitotoxicidad, demostrando este complejo receptor ser el blanco del plomo sobre el desarrollo del SNC (Guilarte, 1997), causando una disminución en la captación de un conocido antagonista del NMDA (3H-MK-801) en regiones cerebrales relacionadas al hipocampo de ratas machos adultas expuestas a plomo con concentraciones sanguíneas de 41.1 $\mu\text{g/dL}$. Sin embargo, ratas hembras expuestas pre y postnatalmente a 9 *ppm* de plomo, evidenciaron un incremento en la captación de 3H-MK-801 en ciertas zonas del hipocampo y áreas corticales temporo-occipitales, todas ellas asociadas con los procesos de aprendizaje, memoria y modulación del comportamiento (Ma y col., 1998). Complementariamente, se demostró que concentraciones nanomolares de plomo, disminuyen la liberación calcio dependiente de glutamato y ácido γ - aminobutírico en ciertas neuronas de hipocampo (Braga y col., 1999).

Sales de plomo inorgánico, son capaces de modular negativamente la actividad de receptores para acetilcolina en distintos sistemas estudiados, interactuando con múltiples sitios de la subunidad α y β del receptor nicotínico, disminuyendo la capacidad transportadora de los canales iónicos asociados al receptor (Zwart y col., 1995; Nagata y col., 1997). Estudios en cultivos *in vitro* de células ganglionares de la raíz dorsal de médula espinal y de células de feocromocitomas, expuestas a concentraciones micromolares de plomo, mostraron un bloqueo selectivo de la actividad de los canales de calcio dependiente del potencial eléctrico de membrana (Evans y col., 1991; Schafer, 1998), alterando potencialmente de esta forma, los sistemas asociados con la conducción neuromuscular.

Diversas acciones de muchas drogas y tóxicos sobre múltiples canales y receptores celulares de diversos tejidos, pueden ser explicados sobre la base de la interacción con sistemas de proteínas quinasas asociadas a la proteína G (Narahashi y col., 1998), habiéndose demostrado la capacidad del plomo para substituir al calcio como segundo mensajero en el metabolismo celular, siendo la activación de la proteínquinasa C (PKC) biológicamente de mayor relevancia que la encontrada para la quinasa dependiente de calmodulina-calcio (kinasa CAM) (Goldstein, 1993).

Complementariamente la menor concentración de AMPc, producto de la activación por plomo de la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina (PDE-CAM), podría disminuir la actividad de la PKA (proteína-quinasa dependiente de AMPc) disminuyendo a su vez la población de canales de calcio en músculo esquelético (Adarmes y González, 1992), y con ello la concentración de calcio disponible para la activación de enzimas quinasas dependientes de calcio. Mayores evidencias sugieren que plomo interactúa negativamente con la proteína G y con la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa (AC) cortical cerebral (Rodríguez y col., 1999), disminuyendo con ello la formación de AMPc a partir de ATP en la membrana plasmática celular. Contrariamente, otros investigadores señalan un alza significativa en los niveles de AMPc, al exponer linfocitos T (CD3) con inhibidores de PDE, en presencia de plomo, sugiriendo que el plomo inhibe el desarrollo y función de linfocitos Th1 (*helper* subtipo 1), al aumentar la actividad de la AC (Yeo y col., 1998).

La modificación de la distribución de PKC inducida por plomo en hipocampo, ha sido relacionada con problemas de aprendizaje, induciendo una mayor traslocación citosólica-membranosa, activando la PKC dependiente de calcio, en cerebro de rata a concentraciones subnanomolares, demostrando una tendencia a la inhibición de todos los tipos de PKC al ser enfrentada a concentraciones micromolares de plomo (Sun y col., 1999). Evidencia reciente, confirma que las vías de transducción intracelular para los GC en cultivos celulares de hepatoma, implica la participación de eventos mediados por calcio e isoformas de la PKC. Plomo (3-10 μ M) bloquea el incremento inducido por dexametasona en la fracción citosólica y particulada de la PKC, incrementando la traslocación desde la fracción citosólica a la particulada de la PKC- β , disminuyendo paralelamente esta migración para el caso de la PKC- α (Tonner y Heiman, 1991). El efecto del plomo sobre la actividad y distribución celular de la PKC en hipocampo de rata, demostró un incremento de la PKC en la fracción citosólica a los 56 días posnatal, encontrándose disminuída la actividad de PKC en la fracción membranosa a los 7 días posnatal (Chem y col., 1998). Varios estudios muestran al plomo actuando como calcio, en los procesos celulares, activando la PKC dependiente e independiente de calmodulina a niveles picomolares, demostrando activar a niveles nanomolares la fosfodiesterasa

dependiente de calmodulina (PDE-CAM) (Goldstein, 1993; Long y col., 1994a). Plomo a niveles picomolares, activa la PKC- α , pero no la PKC- ϵ , Z o M, siendo este efecto aditivo al calcio, activando parcialmente la enzima al interactuar con el sitio Ca1, inhibiendo paralelamente la actividad dependiente de cationes divalentes, presente en el sitio Ca2 del dominio C2 de la PKC. En cambio, como se mencionó anteriormente, a concentraciones micromolares, todos los tipos de PKC fueron inhibidos por medio de la interacción con el dominio catalítico (Sun y col., 1999).

Indirectamente, el plomo disminuye la activación de PKC-CAM, a través del bloqueo de los canales de calcio, como se demostró en células ganglionares (Evans y col., 1991), o en células relacionadas con los osteoblastos, donde además se describió un aumento de permeabilidad mediada por plomo (Wiemann y col., 1999), reportando algunas investigaciones un incremento de calcio plaquetario correlacionado lineal y positivamente a los niveles micromolares de plomo (Dowd y Gupta, 1991), siendo mediado este aumento de calcio intracelular, según algunos estudios, por la modulación en la conformación de fosfoinositoles (IP3 y IP4) que interactúan con receptores de membrana que median la liberación del calcio desde el retículo endoplásmico hacia el citosol (Vig y col., 1994). La PKC, como consecuencia del aumento de calcio citosólico, sufre traslocación desde el compartimento citosólico o soluble, hacia el membranoso, activándose allí en presencia de diacilglicerol. Para realizar su acción, la PKC fosforila una serie de enzimas intracelulares que regulan el ciclo celular, la liberación de hormonas y neurotransmisores, la concentración de receptores de membrana a través del proceso de *down regulation* y otras diversas acciones intracelulares (Adarmes y González, 1992).

Se ha confirmado recientemente, la inhibición por plomo de la bomba de Na/K-ATPasa asociada a retina de ratas en su periodo neonatal (Fox y col., 1991), describiéndose adicionalmente un efecto similar sobre la actividad de la Na/K-ATPasa eritrocitaria *in vitro* y en glóbulos rojos de trabajadores expuestos ocupacionalmente (Grabowska y col., 1991; Grabowska y Guminska, 1996), situación potencialmente extrapolable a otras membranas celulares del organismo.

E. PLOMO Y RADICALES LIBRES:

En estas últimas décadas se ha demostrado que durante la metabolización celular del oxígeno, en condiciones normales o fisiológicas, existe una formación controlada y constante de radicales libres derivados del oxígeno molecular, siendo el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidróxilo (OH) los de mayor relevancia, aunque el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) tiene la capacidad de generar OH, el más reactivo de los radicales (Morello y col. 1998, Lawton y col., 1991). En determinadas circunstancias la cantidad total de radicales puede aumentar en forma descontrolada, situación conocida como *stress* oxidativo. El plomo es capaz de catalizar la peroxidación de ácidos grasos *in vitro*, produciendo adicionalmente un incremento relativo en la concentración de ácido araquidónico en relación al total de ácidos grasos, disminuyendo la proporción relativa de ácido linoléico en hígado, suero y membrana eritrocitaria de pollo (Yiin y Lin, 1995). Complementariamente, el plomo potencia la formación de especies de oxígeno reactivo (ROS) primariamente o inducida por hierro, en preparaciones de células cerebrales, eritrocitos y diversos tejidos (Jiun y Hsein, 1994; Sandhir y col., 1994; Bondy y Guo, 1996); proponiéndose como mecanismos posibles, la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes presentes en condiciones normales, como la superóxido-dismutasa, catalasa y glutatión-peroxidasa (Sugawara y col., 1991; Sandhir y col., 1994), provocando finalmente una alteración estructural asociada a ROS de prácticamente todas las macromoléculas celulares, polimerizando o depolimerizando, rompiendo y entrecruzando enlaces químicos que conducen a una desestabilización de organelos y membranas celulares.

Los mecanismos de alteración por plomo descritos anteriormente sobre las macromoléculas citoplasmáticas, enzimas, segundos mensajeros y canales iónicos, son responsables en su mayoría de los efectos observados en los diversos sistemas

del organismo. Es así que, adicionalmente a los mecanismos mencionados para cada órgano específico, se evidencia una inhibición de la actividad enzimática del citocromo P450 hepático inducida por plomo, pero no por otros metales iónicos usados, sugiriéndose una activación de PKC como proceso responsable de la proliferación de hepatocitos luego de la exposición a plomo (Degawa y col., 1994; Calabrese y col., 1995; Liu y col., 1997).

F. ALTERACIONES GÉNICAS:

Sólo en los últimos años se ha evidenciado efectos del plomo sobre la expresión génica. Los ribosomas requieren iones metálicos divalentes para su integridad funcional, encontrándose una división inducida por plomo del RNA ribosomal en zonas determinadas dentro de la secuencia de nucleótidos, actuando en los mismos sitios de unión para Mg, Mn, Ca y Zn, hidrolizando varias prominencias, dedos (fingers) y secuencias en hebras simples de RNA, además de un sitio contiguo a la región implicada tanto en la captación del RNA de transferencia, como en la actividad de la peptidiltransferasa (Winter y col., 1997; Ciessiolka y col., 1998).

G. CONSECUENCIAS CARDIOVASCULARES:

El sistema cardiovascular, también muestra los efectos de la exposición crónica a plomo; demostrando el corazón una mayor sensibilidad a arritmias inducidas por norepinefrina (NE), en conjunto con una alteración en la función mitocondrial y la conducción, debido presumiblemente a una inhibición en la fosforilación de las proteínas de las miofibrillas cardiacas (Hatch, 1987; Castano y col., 1991). La hipertensión arterial asociada a la exposición laboral a plomo es un fenómeno bien conocido, relacionado a un mayor nivel de catecolaminas circulantes, disminuyendo consecuentemente la concentración de receptores β -adrenérgicos vasculares (Chang y col., 1997a).

H. EFECTOS ENDOCRINO-REPRODUCTIVOS:

Muchas investigaciones han descrito las consecuencias del plomo sobre los órganos reproductivos y su regulación hormonal. Abortos, partos prematuros, disfunciones ovulatorias con bajos parámetros reproductivos, son comúnmente asociados a plomo. Una disminución por plomo, en la producción de prostaglandina E₂ inducida por NE en preparaciones *in vitro* de eminencia media (hipotálamo) de ratas machos, provoca finalmente una secreción menor del factor liberador de la hormona luteinizante (LHRH) dependiente de prostaglandina (Bratton y col., 1994), no reportando otros estudios alguna alteración en los niveles séricos de LH, FSH (hormona estimulante de los folículos) y testosterona, reduciendo a la vez el número de espermios en epidídimo, la cuenta total de espermios y la motilidad espermática con un porcentaje mayor de aberraciones morfológicas asociadas a concentraciones en el agua de bebida de 0.25% a 0.5% de plomo (Wadi y Ahmad, 1999). No hace mucho, se confirmó el efecto citoprotector de la vitamina E y/o C, sobre el daño por ROS inducido por plomo en espermio de rata, mejorando la motilidad espermática y la tasa de penetración ovocitaria (Hsu y col., 1998).

La exposición a plomo en ratas durante etapas tempranas del desarrollo, provoca una disminución en la captación ovárica de LH y FSH secundaria a una alteración en la cantidad de receptores para gonadotrofinas, disminuyendo el metabolismo de la progesterona en ovario, demostrando que los cambios en los receptores hormonales y/o la esteroidogénesis gonadal parecen ser un indicador sensible de los efectos adversos del plomo en la ausencia de signos clínicos incipientes (Wiebe y col., 1988). El peso al nacimiento y la tasa de crecimiento prepuberal y puberal fueron disminuidas, explicadas en alguna medida por bajas concentraciones séricas (asociadas a plomo) del factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1), sumado a un contenido pituitario aumentado de somatostatina (GH), un disminuido perfil en la actividad de las enzimas hepáticas inducido-dependientes para GH, y una concentración atenuada en los niveles puberales de testosterona (machos) y de 17-β estradiol (hembras) (Luthman y col., 1994). Exposiciones a plomo durante la tercera semana de gestación en ratas, provocan en sus hijos un irregular patrón de liberación de FSH y LH (McGivern y col., 1991); demostrando otras

investigaciones una alteración directa en la actividad metabólica del blastocisto o cambios en la composición de la secreción uterina (Nilsson y col., 1991).

Desde un punto de vista fisiológico, los cambios experimentados por el útero bajo la acción de los estrógenos pueden ser explicados por dos mecanismos de acción independientes. El primer mecanismo está mediado por el receptor citosólico-nuclear y es responsable de las respuestas genómicas, representadas por un aumento del RNA, contenido proteico, hipertrofia uterina y número de mitosis observadas (Jensen y De Sombre, 1972; Grunert y col., 1986). El segundo mecanismo descrito, está mediado por la migración inducida por estrógenos, de leucocitos eosinófilos (EOS) al útero, explicado por la existencia de receptores de alta afinidad y especificidad presentes en la superficie de los EOS; reconociendo a su vez los receptores presentes en el endotelio de los vasos sanguíneos uterinos al estrógeno ya unido al receptor del EOS, provocando la interacción y posterior adhesión del EOS con los vasos sanguíneos uterinos, favoreciendo de esta forma la migración hacia el espacio extravascular uterino, determinando finalmente la aparición de edema y aumento de permeabilidad vascular (Tchernitchin y col., 1985; Tchernitchin y col., 1989). Dosis altas de plomo vía endovenosa aplicadas en ratas prepúberes, muestran una potenciación de la hipertrofia uterina inducida por estradiol, aumentando además la eosinofilia uterina, determinándose una reducción del tiempo de inducción mitótica que ocurre fisiológicamente bajo el efecto de la estimulación estrogénica en los grupos expuestos a plomo (Tchernitchin y col., 1998).

i. ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS:

Cuando el sistema inmune funciona apropiadamente, los agentes potencialmente peligrosos para el organismo son neutralizados y eliminados rápida y eficientemente. Sin embargo, muchos agentes ambientales pueden alterar esta eficiente respuesta, a través de la acción directa e indirecta de químicos (o sus metabolitos) sobre la respuesta inmunológica o sobre los propios antígenos modificados por productos químicos. La exposición a metales puede desregular la respuesta inmunológica, gatillando hipersensibilidad o autoinmunidad, siendo

capaces adicionalmente de suprimir los mecanismos de defensa inmune, aumentando la susceptibilidad a agentes infecciosos y al desarrollo de enfermedades neoplásicas (Zelikoff y col., 1993).

Se ha investigado las consecuencias del plomo sobre el sistema inmune, especialmente el efecto en poblaciones con alto riesgo ocupacional o expuestas geográficamente a niveles de contaminación ambiental significativas. Redig y col. (1991), demostraron que una elevada concentración de plomo en halcones, produce una significativa disminución en la respuesta linfocitaria mitógena, pero no tiene efectos sobre los títulos de anticuerpos circulantes. Estudios en trabajadores expuestos a plomo, revelan una importante disminución en el número y porcentaje absoluto de linfocitos T CD3+ y CD4+, sin cambios en la población de linfocitos CD8+, demostrando además, una alterada función de células T determinada por una inadecuada respuesta a mitógenos (Fischbein y col., 1993). Datos obtenidos, indican una reducción asociada a plomo, en la respuesta proliferativa celular en médula ósea y bazo, inducida por el factor estimulador de colonias macrofágicas (CSF-1), explicando de esta forma el incremento en la mortalidad de ratones expuestos a Listeria monocitogenes experimentalmente. La disminuída actividad proliferativa linfocitaria, adicionalmente se acompaña de una alterada inmunidad humoral. Ratones tratados intraperitonealmente con inyecciones de plomo, seis días antes de la inmunización con eritrocitos de oveja y de hamster, presentaron títulos de anticuerpos considerablemente menores que sus correspondientes controles (Tone y col., 1991), reportándose una disminución en la concentración de β y γ globulinas, acompañado de un aumento de parásitos recuperados en ratones infestados con huevos de Hymenolepis nana, pero previamente tratados con nitrato de plomo (Khanna y Jhori, 1991).

Estudios realizados posteriormente, demostraron en trabajadores expuestos laboralmente, que un nivel aumentado de plomo en sangre (46.9 $\mu\text{g/dL}$ en promedio), se relaciona con una concentración disminuida de inmunoglobulinas evaluadas en sangre (Castillo-Mendez y col., 1993). No obstante, se encontró que en cultivos de linfocitos humanos, el plomo causa un significativo aumento en la producción de

inmunoglobulinas (Borella y Bargellini, 1993); descubriéndose altos niveles de IgE (sobre 400 $\mu\text{L/mL}$) en un grupo de trabajadores analizados con niveles de plomo sanguíneo de más de 60 $\mu\text{g/dL}$ (Horiguchi y col., 1992); fenómeno demostrado también en niños entre 9 meses y 6 años de edad, con altos niveles de IgE asociada a concentraciones de plomo entre 1 a 45 $\mu\text{g/dL}$ (Lutz y col., 1999).

La actividad inmunológica mediada por macrófagos y células NK (del inglés *natural killer*) se ve alterada por la exposición a plomo, demostrada por la disminuía actividad citolítica frente a Candida albicans de macrófagos aislados de trabajadores con niveles de plomo, incluso bajo los 60 $\mu\text{g/dL}$, denotando probablemente una alterada actividad de la mieloperoxidasa (Queiroz y col., 1994); reportándose por otro lado, macrófagos con una quimiotaxis y actividad reductiva (óxido-reducción) disminuida, sugiriendo que el efecto inmunosupresivo podría constituir un indicador sensible de la exposición a este metal (Queiroz y col., 1993).

Los cambios en la población de células T, B y NK observados en trabajadores expuestos a plomo, fueron reportados por Sata y col. (1997), encontrando en uno de sus recientes estudios una significativa disminución en el número de células NK, con un aumento de células T citotóxicas (CD8+) sólo en el grupo de trabajadores con más de 20 $\mu\text{g/dL}$ de plomo en sangre.

Células CD8 no comisionadas provenientes de timo, son predestinadas a ser citotóxicas en su vida futura. Sin embargo, para el caso de linfocitos CD4 (*helper*), el mecanismo es más complejo. En 1986, se demostró la existencia de dos subpoblaciones de células T CD4, las Th1 y las Th2, las que producen diferentes citoquinas y poseen funciones distintas. Las Th1 son denominadas “inflamatorias” y son especializadas en la activación de macrófagos a través de la secreción de γ -interferón, TNF (factor de necrosis tumoral), factores de estimulación granulocítico-macrofágico, secretando además interleuquinas (IL2 e IL3). Las células Th2 son especializadas en la activación, proliferación de células B y síntesis de anticuerpos, secretando factores de crecimiento como la IL4, IL5, IL6, IL10 y varias otras

citoquinas (Janaway y Travers, 1994; Pearce y Reiner, 1995). Interesantemente, algunos metales como el mercurio y el plomo pueden inhibir los mecanismos de regulación de la respuesta inmune mediada por células, pudiendo estimular la actividad humoral (Zelikoff y col., 1993). En 1991, Mc Cabe y Lawrence, demostraron la capacidad del plomo para estimular la producción de anticuerpos producto de la interacción de linfocitos B y Th2, en desmedro de la activación de las células Th1, favoreciendo con ello la susceptibilidad a infecciones bacterianas o virales. La adición de $PbCl_2$ *in vitro*, favorece la proliferación de células Th2, incrementando significativamente la producción de IL4, disminuyendo a su vez, la proliferación de Th1 y su producción de γ -IFN. En el mismo estudio, la producción *ex vivo* de IL4 por linfocitos T esplénicos (CD3) fue estimulada, disminuyendo adicionalmente la producción de γ -IFN, encontrándose en los ratones analizados, niveles plasmáticos aumentados de IL4 e IgE con bajos niveles de γ -IFN (Heo y col., 1996). Recientes reportes hechos por los mismos autores, sugieren que el plomo puede inhibir el desarrollo de Th1 a través del aumento de la actividad de adenilato-ciclasa, incrementando los niveles intracelulares de AMP cíclico (Yeo y col., 1998). En efecto, tanto el aumento del AMP cíclico, como la disminución del GMP cíclico, se encuentran asociados con una disminuída respuesta y actividad linfocitaria, expresada por una menor síntesis de ADN, ARN y proteínas funcionales, disminuyendo además la producción de factores quimiotácticos (Muller y col., 1990). Complementariamente, estudios realizados en 1999 por Boscolo y col., confirmaron en hombres atópicos con moderados niveles de plomo sanguíneo (11 μ g/dL) al ser comparados con grupos con plumbemias inferiores, una disminuida relación Th1/Th2 en sangre, acompañado de un aumento en el número de células B y de IgE, sugiriendo que el plomo puede favorecer la incidencia de atopia en poblaciones urbanas expuestas ambientalmente.

El efecto del plomo sobre las distintas citoquinas ha sido también analizado. Se encontró una inhibición por plomo (aunque reversible), en la respuesta proliferativa de células de hibridoma B-9 mediada por la adición *in vitro* de IL6 (Orupapo y col., 1992); encontrándose potenciada la producción de IL6 cerebral en modelos experimentales

de shock endotóxico inducido por lipopolisacárido de pared bacteriana (LPS), favoreciendo el plomo de esta forma, la disfunción cerebral asociada a sepsis (Kishikawa y Lawrence, 1998).

La desregulación del sistema inmune puede explicarse, en algún grado, por la alteración en la concentración y/o la actividad del TNF e IFN, demostrado por el incrementado nivel de TNF acompañado de una reducción en la síntesis de IFN, en leucocitos bovinos inducidos *in vitro* e incubados simultáneamente con plomo. Además se encontró al estudiar leucocitos sanguíneos de vacas tratadas previamente con plomo vía oral, una producción disminuida de IFN inducido por virus, en conjunto con niveles de TNF comparables a los controles. (Kaminska y col., 1998) Contrariamente, en otros modelos *in vitro*, se encontró en macrófagos pulmonares de conejos una disminución por plomo en la producción de α -TNF inducido por LPS, afectando con esto la citotoxicidad inmunológica mediada por células (Cohen y col., 1994). Sin embargo, nuevos estudios realizados en células mononucleares humanas incubadas con plomo y estimuladas con LPS para producir α -TNF, confirmaron la aumentada síntesis de α -TNF encontrada en los estudios anteriores, revelando además una sobreexpresión del receptor (postranscripcional) de membrana para TNF (TNF-Rp55) y un incremento en la reactividad y captación celular de esta citoquina por monocitos (Guo y col., 1996).

J. INTEGRACIÓN INMUNOENDOCRINA:

Uno de los más excitantes y novedosos hallazgos en biología, demostró un lenguaje bioquímico común para el sistema inmune y neuroendocrino, encontrado la presencia de receptores para péptidos neurotransmisores y hormonas en células del sistema inmune, sugiriendo que los peptidos que regulan el cerebro y el sistema endocrino, son a su vez sustancias inmunomoduladoras; descubriéndose recíprocamente receptores para diversas citoquinas en cerebro y células endocrinas, reforzando la evidencia de la comunicación bidireccional antes señalada (Blalock, 1994).

La interacción entre el sistema inmune, nervioso y endocrino, es comúnmente representada por los efectos del *stress* sobre la inmunidad, siendo el eje hipotálamico-pituitario-adrenal (HPA), un prototipo para ejemplificar la respuesta fisiológica integrada frente al *stress*. Factores tales como el *stress* emocional, físico o químico, dolor, trauma, hipoxia, hipoglicemia aguda, exposición a frío, cirugía o pirógenos, han demostrado activar el eje con la consecuente alza en los niveles de adrenocorticotrofina (ACTH) y cortisol adrenal (Nichols y Thompson, 1995).

Receptores para péptidos hormonales y neuropéptidos fueron descritos en timo, bazo y diversas células inmunes, dentro de los cuales están los aislados para somatostatina (GH), prolactina (PRL), hormona liberadora de corticotrofina (CRH), ACTH, hormona liberadora de tirotrófina (TRH), oxitocina (OT) y otras hormonas de origen hipotalámico, incluyendo las β -endorfinas (Dardenne y Savino, 1994). Las primeras citoquinas en las cuales se confirmó actividad sobre células nerviosas y endocrinas fueron los interferones, causando esteroidogénesis, melanogénesis, captación de yodo, excitación de neuronas y de receptores opiáceos. Posteriormente se comprobó que la interleuquina 1 (IL1) tiene un efecto directo en la liberación de CRH hipotalámica, en tanto se investiga el efecto hipotalámico-pituitario de la IL2, IL3 e IL6. Estudios radioautográficos en criosecciones de cerebro de ratón, demostraron una distribución de receptores para las diferentes interleuquinas, concentradas en hipocampo, meninges, plexo coroideo y pituitaria anterior, pudiendo explicar los efectos sobre el comportamiento de las citoquinas estudiadas (Blalock, 1994). Simultáneamente, fueron aislados receptores linfocitarios y macrófágicos para epinefrina, dopamina, serotonina, histamina y para algunas hormonas esteroidales como estrógenos, progesterona, andrógenos y cortisol (Vinitzky y Taibo, 1997).

K. HORMONAS ESTEROIDALES Y SU EFECTO SOBRE EL SISTEMA INMUNE:

Se conoce la capacidad de las hormonas esteroidales para modular la respuesta inmune, sin embargo, los mecanismos de acción no están del todo aclarados. El tratamiento con estrógenos en roedores, provoca secreción aumentada de inmunoglobulinas estimuladas por diversos antígenos, declinando

concurrentemente la respuesta inmune mediada por células, encontrándose un significativo número de receptores para 17-β estradiol en linfocitos T CD8+ de bazo humano (Stimson, 1988). Dentro de los esteroides adrenales sintetizados, la zona reticulada es encargada de producir una prohormona androgénica denominada dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS), activándose en los órganos blanco periféricos (Feldman, 1983), encontrándose receptores en linfocitos T para la hormona libre. DHEAS bloquea la habilidad de los glucocorticoides para causar apoptosis de timocitos, favoreciendo de esta forma (indirectamente) el aumento de células Th1, además de afectar en forma directa el balance entre Th1:Th2 hacia las células Th1 preferentemente (Rook y col., 1994). Apoptosis es observada normalmente en células T seleccionadas negativamente, linfocitos irradiados, células blanco atacadas por linfocitos CD8, tumores en regresión y timocitos expuestos a GC (Tchernitchin y col., 1990; Schwartz y Osborne, 1993).

Tanto la zona fasciculada como la zona reticular de la corteza adrenal producen cortisol en volumen bajo, debido a que la conversión de colesterol a pregnenolona es la fase limitante en la esteroidogénesis adrenal, requiriendo ACTH para llevar a cabo un volumen secretorio normal, vía activación de la adenilato ciclasa y consecuente aumento de la concentración de AMPc, activando con esto las fosfoproteínas quinasas intracelulares adrenales (Feldman y Nelson, 1996). La proporción en la producción adrenal de cortisol y corticosterona, es diferente entre algunas especies de mamíferos, encontrándose relaciones de cortisol:corticosterona de entre 4:1-10:1 en el hombre, 2:1-5:1 en el perro, 1:10 en el conejo y 1:10 en las ratas de laboratorio (Mulnix, 1987). Receptores para glucocorticoides fueron encontrados *in vivo* en la superficie celular y citoplasma de eosinófilos y en el núcleo de células reticulares, plasmocitos, células endoteliales y macrófagos, pero no en linfocitos, linfoblastos y plasmoblastos de ganglios linfáticos y de bazo de conejo (Tchernitchin y col., 1984), encontrándose además en linfocitos tímicos de rata y células de linfoma (Ortí y col, 1992).

Los glucocorticoides (GC) preparan al organismo para enfrentar el *stress*. En general, ellos inhiben la síntesis de DNA, no obstante, en muchos tejidos ellos

también inhiben la síntesis de RNA y de proteínas, acelerando el catabolismo proteico, fenómeno responsable del efecto sobre músculos, huesos y tejido conectivo. En contraste, la síntesis de RNA y proteínas se ve estimulada en hígado por efecto glucocorticoidal. El efecto producido sobre la síntesis de proteína en las células blanco está probablemente determinado por el *aporeceptor*, del cual hay más de un tipo dentro de una misma célula y entre células de distintos tejidos (Feldman y Nelson, 1996). La información obtenida a partir de animales de laboratorio y de estudios *in vitro* con linfocitos T humanos, ha demostrado que los efectos de los GC están mediados por la estimulación en la síntesis del RNAm dependiente del ADN y del ARN ribosomal en el núcleo de células diana, pudiendo también ejercer sus efectos de forma postranscripcional, alterando la secreción de una proteína o aumentando la degradación del RNAm (Boumpas, 1993). Aunque se supone que actúan vía receptores específicos, se ha propuesto como mecanismo de acción una respuesta genómica mediada por el receptor citosólico-nuclear, otros efectos no genómicos mediados por receptores en eosinófilos u otras células migratorias y/o respuestas mediadas por el sistema receptor adenilato (o guanilato)-ciclase dependiente (Tchernitchin y col., 1984). El receptor (R) libre no asociado a hormona (referido como aporeceptor) capta el GC en el espacio citoplasmático donde forma el complejo GC-R, translocándose al núcleo, para unirse a los elementos reguladores de genes (HRE), ejerciendo una inducción proteica positiva (transactivación) o negativa (transrepresión) sobre la expresión génica (Cunningham y Lees, 1994). Dentro del proceso inflamatorio, los GC interactúan con las secuencias promotoras de los genes diana, gatillando la transcripción de muchas proteínas como la lipocortina-1, la que es un potente inhibidor de la fosfolipasa A₂ (enzima hidrolizante de ésteres de membrana), o provocando una disminución en la transcripción de proteínas inflamatorias a través de la fijación a factores transcripcionales, disminuyendo la síntesis de receptores para neurocininas, sintetasa inducible del óxido nítrico, ciclooxigenasa II, endotelina I, fosfolipasa A₂ y para diversas citoquinas como la IL2 linfocitaria (Page y col., 1998).

Sorprendentemente, se ha descrito un receptor para GC (y otras hormonas esteroideas) presente en la membrana celular en hígado de pollo, cerebro y riñón de

rata, corteza adrenal bovina y diversos tejidos de mamíferos y anfibios; pudiendo corresponder a un tipo estructural distinto o a una modificación del receptor citosólico-nuclear (RCN) tradicionalmente descrito. Al igual que el RCN, el receptor esteroide de membrana plasmática sufre fosforilación y debe asociarse a las proteínas de choque térmico (HSP) para realizar su función, la que sería responsable de una respuesta no-genómica y de la regulación rápida de la respuesta genómica. No obstante, la mayoría de los estudios descritos a continuación se basan en la descripción estructural y funcional del receptor esteroide citosólico-nuclear. (Falkenstein y col., 2000)

La superfamilia de receptores esteroidales, como se ha denominado al receptor para estrógenos, andrógenos, progesterona, tiroxina, ácido retinoico, vitamina D3, mineralocorticoides y glucocorticoides, se estructura en seis dominios (A-F) con funciones separadas: uno destinado a la captación de la hormona, dimerización y activación transcripcional (E), otro encargado de la unión al ADN (C), un tercer dominio (D) pobremente conservado dentro de la familia de los receptores nucleares que contribuye al reconocimiento del DNA junto al dominio C, consistiendo los dominios A/B y F en secuencias aminoacídicas pequeñas con propiedades promotoras específicas de activación transcripcional (Carson-Jurica y col., 1990; Glass, 1994). En la ausencia de ligandos específicos, el R esteroide es mantenido inactivo, incapaz de interactuar con el DNA gracias a la asociación a proteínas de choque térmico (HSP), siendo comúnmente implicada la HSP90 (90 KDa), formando complejos oligoméricos con receptores para GC, estrógenos, progesterona y andrógenos; identificándose en investigaciones posteriores, la participación de otras proteínas como la HSP70 y HSP56 (Ortí y col., 1992). Cada R para GC forma un dímero uniéndose con dos HSP90 citoplasmáticas cada uno, las cuales son liberadas antes de la interacción del R con las secuencias génicas reguladoras. Posteriormente el R debe activarse para luego fosforilarse, requerimiento esencial no sólo para la activación de los elementos reguladores de hormona en el núcleo, sino también para restaurar la capacidad del R libre para captar la hormona a través de su reconstitución con la HSP90. Los R para GC recirculan y son reutilizados en un ciclo que involucra fosforilación/defosforilación dependiente de ATP, disminuyendo esta

fosforilación en ciertas formas halladas en el núcleo (*null receptor*), siendo regulada su actividad biológica por quinasas y fosfatasas (Carson-Jurica y col., 1990; Ortí y col., 1992); siendo descritos anteriormente los diversos efectos del plomo sobre los distintos tipos de PKC en tejido nervioso y hepático (Goldstein, 1993; Long y col., 1994b; Chen y col., 1999; Sun y col., 1999). Tanto GC como plomo inducen la síntesis de proteínas específicas, tales como HSP27 y HSP90 (Opanashuk y Finkelstein, 1995; Selvin-Testa y col., 1997), las cuales si bien podrían contribuir al mayor reciclaje y recirculación citoplasmático-nuclear del R para GC, no provocarían una mayor captación hormonal ni una mayor actividad transcripcional, debido a que estos procesos son dependientes de energía, la que precisamente está depletada por plomo.

La exposición a *stress*, especificado como térmico, químico o isquémico, activa la producción de HSP por la célula, jugando un rol importante en la termotolerancia y protección de los diversos procesos bioquímicos celulares. Algunos metales pesados como cadmio, zinc y arsénico, inducen en preparaciones *in vitro* de hepatocitos de ratas, la producción de HSP y otras proteínas con rol citoprotector como las metalotioneínas, pudiendo ser inducidas adicionalmente por catecolaminas y GC (Bauman y Klaassen, 1993). Exposiciones a plomo en el periodo pre y posnatal, inducen la formación de HSP70 en neuronas no piramidales y astrocitos de hipocampo de rata, provocando edema astrogial, alterando potencialmente la interacción entre las células piramidales y la astroglia con la consecuente alteración de la función cerebral (Selvin-Testa y col., 1997); evidenciándose en investigaciones sucesivas una apoptosis neuronal producto de la estimulación glutaminérgica potenciada por plomo, provocando a su vez, una mayor expresión inducida por glutamato de los genes para HSP70 y para ciclooxigenasa II (Savolainen y col., 1998).

Aunque nuevos segundos mensajeros han sido descubiertos y descritos en los últimos 10 años, los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc siguen siendo los mejores caracterizados, estando su rol en la diferenciación y control de procesos metabólicos del sistema endocrino, ampliamente reconocido. Alternativamente a la circulación de

los nucleótidos cíclicos (NC) fuera de la célula, las fosfodiesterasas (PDE) son responsables de la inactivación intracelular de GMPc y AMPc; descubriéndose al menos 5 grupos de isoenzimas de PDE presentes en distintos tejidos, mediando todas ellas la regulación en los niveles de NC para diversas sustancias como FSH, TSH, epinefrina, agonistas muscarínicos, insulina y dexametasona entre otras. Complementariamente se han encontrado PDE tanto en linfocitos, como en polimorfonucleares (PMN), encontrándose de forma fisiológica la PDE inhibida por GMPc (cGi-PDE) y la PDE específica para el AMPc (cAMP-PDE) (Conti y col., 1991; Page y col., 1998). La administración de estrógenos incrementa la expresión de PDE en oviducto de codorniz, ocurriendo también en la PDE prostática al ser expuesta a estimulación androgénica. La incubación de adipocitos con GC, produce una disminución en la activación de la cGi-PDE dependiente de insulina y epinefrina (Conti y col., 1991). Investigaciones recientes se han concentrado en el efecto del plomo sobre las PDE retinales, inculpadas progresivamente como uno de los factores responsables en la apoptosis de bastones y células bipolares en retina, consecuencia de la disminución en la actividad de la cGMP-PDE, de una manera dependiente de la concentración de plomo y de la edad de desarrollo neonatal en ratas, aumentando finalmente la concentración no sólo de GMPc, sino también del calcio intracelular, disminuyendo la síntesis de ATP mitocondrial (Fox y col., 1997; Fox y col., 1998).

Dosis comúnmente usadas de GC, no afectan la producción de anticuerpos por los linfocitos B, en tanto que dosis incrementadas, disminuyen la concentración de IgG, IgA y en menor grado las IgM, no siendo afectada la síntesis de IgE (Feldman y Nelson, 1996). Linfocitos del *pool* circulante se redistribuyen al espacio extravascular en presencia de GC (ganglios linfáticos, bazo, médula ósea y ducto torácico), siendo afectados los linfocitos T en mayor proporción que los linfocitos B, debido a su mayor participación dentro del *pool* circulante (70%). La distribución de las células CD4 (*helper*) es particularmente afectada por los GC, resultando la tasa de retorno hacia el compartimento vascular profundamente afectada, siendo los CD4 virtualmente inmobilizados en el espacio extravascular luego de la infusión de metilprednisolona (Ottaway y Husband, 1994). La respuesta proliferativa linfocitaria es suprimida por GC, disminuyendo la respuesta a mitógenos, suprimiendo la síntesis de linfoquinas y

el reconocimiento de antígenos, además de disminuir la actividad citotóxica (Papich y Davis, 1989). Las membranas celulares PMN son estabilizadas por GC, sólo en dosis suprafarmacológicas, suprimiendo levemente o de ninguna forma la fagocitosis bacteriana en humanos y bovinos, afectando la destrucción posterior de bacterias fagocitadas. No obstante, monocitos y macrófagos son más sensibles que los PMN, demostrando disminuir la habilidad fagocitaria, bactericida y de presentación antigénica (Papich y Davis, 1989; Muller y col., 1990). Los GC adrenales afectan profundamente la regulación del sistema inmune a través de la supresión en la producción y actividad de diferentes citoquinas, inhibiendo la IL1, IL2 e IFN entre algunas otras (Vinitzky y Taibo, 1997).

L. INFLUENCIAS DEL PLOMO SOBRE LAS CATECOLAMINAS Y SOBRE LAS HORMONAS ESTEROIDALES:

Investigaciones, aunque escasas, han descrito el efecto del plomo sobre las catecolaminas, hormonas tiroideas y cortisol adrenal, de ratas expuestas a este metal, indicando una reacción *stress* específica inducida por plomo sólo en las hembras, explicada por un nivel de noradrenalina disminuída en el hipotálamo y en el cuerpo estriado, con aumentos significativos de catecolaminas y cortisol circulantes, sin afectar los niveles de T3 y T4 (Vysocil y col., 1991). La presión sanguínea elevada encontrada en trabajadores expuestos a plomo laboralmente, se explicaría en alguna medida por la facilitación de una o más vías participantes en la síntesis adrenal de aldosterona, aumentando la concentración final de este mineralocorticoide, tanto *in vitro* como *in vivo* (Goodfriend y col., 1995). Se conoce la capacidad del plomo para alterar el sistema nervioso central (SNC) y periférico, produciendo hiperactividad del sistema nervioso simpático (Carsia y col., 1995), siendo la hipertensión asociada a la exposición a plomo, producto de un alza en los niveles de catecolaminas circulantes y una disminución de los niveles de AMPc y de receptores β adrenérgicos de origen vascular (Chang y col., 1997b). Bajos niveles de plomo, incrementan la sensibilidad de los R dopaminérgicos (D1-D2) frente a los agonistas experimentales y a seleccionadas drogas tales como apomorfina, cocaína y anfetamina (Cory-Slechta y Widzowsky, 1991). El incremento en las catecolaminas

circulantes, se explicaría por la mayor estimulación del sistema de proteína quinasa II dependiente de calcio/calmodulina, requiriéndose la presencia de calcio para este efecto (Ramin y Porter, 1997), aumentando posiblemente la secreción de catecolaminas adrenales, ganglionares periféricas y del SNC, a través de una mayor fusión de membranas y una marcada exocitosis de vesículas sinápticas hacia la hendidura sináptica o al torrente sanguíneo (glándulas adrenales).

Cultivos celulares de hepatoma (H4-II-C3) incubados *in vitro* con dexametasona, demuestran una inducción enzimática, mediada por receptores específicos, en la actividad de la tirosina-aminotransferasa (TAT). Plomo, en un patrón dosis dependiente, inhibe la actividad específica de la TAT, no siendo explicada por la variación en el número celular, la incorporación de timidina o por la alteración de procesos relacionados con la captación del receptor citosólico para GC; señalando que la exposición aguda a plomo en células hepáticas, podría incrementar el recambio de la TAT, debido a la interacción sobre la transcripción, traducción o eventos postraduccionales, pudiendo afectar la fosforilación de las PKC participantes en el sistema de amplificación bioquímica asociada al receptor para GC (Heiman y Tonner, 1995). La capacidad del plomo para disminuir la concentración final de proteínas que contienen grupos sulfidrilos en cerebro de rata (Dabrowska-Bouta y col., 1996), puede ser aceptado como mecanismo potencial para explicar como el plomo podría alterar la habilidad del receptor esteroide para captar la hormona una vez que esta penetra la membrana celular, produciéndose una disminuida afinidad entre el R y la hormona esteroide. En efecto, se ha descrito la inhibición de concentraciones micromolares de plomo en la captación al DNA de factores transcripcionales (proteínas) conteniendo *fingers* ricos en cisteína e histidina, describiéndose con ello, un nuevo efecto deletéreo sobre la fisiología molecular (Hanas y col., 1999). En el mismo sentido, la superfamilia de receptores esteroidales, posee secuencias de aminoácidos homólogos, distinguiéndose tres regiones (C1 a C3) altamente conservadas para todos los miembros de esta familia. La región C1, ubicada en el extremo N-terminal, contiene 66-68 aác., con 2 *fingers* de Zn^{+2} y 9 cisteínas perfectamente conservadas, constituyendo el dominio captador de DNA (DBD) (Carson-Jurica y col., 1990). En tanto, la zona ubicada en la región C-terminal

del R, comprende 250 aác. que son responsables de la captación de la hormona esteroïdal, detectándose cisteína en posición 656 y 754, y metionina en posición 622 del R para GC de rata; actuando en conjunto para la captación de la hormona a pesar de estar distantes dentro de la secuencia aminoacídica lineal (Ortí y col., 1992).

M. EL ROL INMUNOMODULADOR DE LOS LEUCOCITOS EOSINÓFILOS:

Se ha atribuido a los leucocitos eosinófilos (EOS) un rol inmunomodulador, explicado por la inhibición en la proliferación de linfocitos, consecuencia de la liberación del contenido de sus gránulos, proceso ocurrido luego de la migración hacia timo y bazo inducida por GC endógenos y exógenos (Tchernitchin y col., 1990). En efecto, ACTH o cortisol reducen dramáticamente el número de EOS en sangre, observándose un significativo incremento en la eosinofilia tisular en pulpa roja, sustancia cortical, médula, hilio, cápsula y espacio subcapsular de bazo y en corteza, médula y cápsula de timo (Sabag y col., 1978). Marcas radioautográficas para el R de GC fueron encontradas en células musculares lisas y endoteliales de arterias esplénicas centrales y trabeculares, en conjunto con endotelios de pulpa roja y EOS (Tchernitchin y col., 1984). Se ha sugerido para los mecanismos que median la migración de los EOS a los tejidos linfoides en presencia de GC, una interacción similar al ocurrido entre el receptor para estradiol de los EOS y los endotelios de los vasos sanguíneos uterinos (ver más atrás), proponiéndose un rol fisiológico de los GC endógenos en la modulación de la respuesta inmune (Tchernitchin y col., 1985; Tchernitchin y col., 1990).

Alternativamente, la localización de EOS en los tejidos es actualmente atribuida a la familia de moléculas de adhesión que son inducidas sobre los EOS circulantes y las células endoteliales durante la inflamación. Es así como IL1 de origen linfocitario, induce la expresión de moléculas de adhesión sobre la superficie de los EOS, tales como las integrinas, mec-1 y el antígeno de presentación tardía (VLA-4), de los cuales, las integrinas son las principales responsables de la unión a las moléculas de adhesión intracelular de origen endotelial (ICAM-1); siendo la VLA-4 expresadas específicamente en los EOS y no en neutrófilos. Complementariamente,

IL4 induce la expresión de moléculas de adhesión vascular (VAM-1) de origen endotelial, las cuales se unen específicamente a los VLA-4 de los EOS, requiriendo además de las moléculas de superficie CD11 y CD18 para su actividad migratoria hacia los tejidos (141). Contrariamente, los GC desvían la respuesta linfocitaria hacia los linfocitos Th2, suprimiendo paralelamente diversas citoquinas como las IL1 e IL5, además de inhibir la expresión de moléculas de adhesión endotelial como la E-selectina y la ICAM-1 (Ottaway y Husband, 1994; Rook y col., 1994).

N. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA EXOCITOSIS DE LOS GRÁNULOS DEL EOSINÓFILO:

El proceso de exocitosis del contenido de los gránulos de EOS, más pronunciado en roedores que en humanos, es consecuencia de la activación observada luego de la interacción de receptores específicos de membrana celular con IgG, IgA e IgE y de la estimulación directa con mediadores solubles como el factor de activación plaquetario (PAF) y leucotrieno B4 (LTB4), aunque estudios sugieren que la adherencia de los EOS a fibronectina, aumenta la producción de leucotrienos, señalando que las proteínas de la matriz extracelular pueden servir como un estímulo extravascular para la activación de EOS. Investigaciones demostraron que la fosforilación proteica, especialmente de tirosina, es una importante señal de transducción mediada por receptores de superficie celular, sugiriéndose que esta activación es el resultado de un aumento o una persistente fosforilación (Spry y col., 1992), la que adicionalmente interviene aparentemente en el proceso de apoptosis de los EOS, debido a un incremento en la actividad de las proteínquinasas y fosfatasas, pudiendo activar la expresión de genes que inducen o bloquean la muerte celular programada (Simon y Blaser, 1995). Investigaciones llevadas a cabo por Tchernitchin y col. (1985), demostraron en ratas hembras ovariectomizadas, una degranulación de EOS circulantes *in vitro* e *in vivo* inducida por la acción de estradiol; observándose este fenómeno en ratas inyectadas con progesterona, donde se evidenció una mayor degranulación de EOS en bazo, señalándose como un mecanismo probable, la mediación de progesterona en la degranulación de EOS luego de la migración a los tejidos linfoides inducidos por GC, dada la afinidad de la progesterona por algunos

tipos de R para GC, actuando de esta forma como agonista parcial, encontrándose en otros tejidos un efecto contrario (Castrillón y col., 1982).

O. LOS EOSINÓFILOS EJERCEN SUS EFECTOS A TRAVÉS DE LA ACCIÓN DE SUS GRÁNULOS:

Eosinófilos jóvenes y maduros son densos, debido al contenido de gránulos esenciales para su función compuestos de diversas sustancias reactivas. Dentro de los tres tipos de gránulos existentes, los secundarios o específicos contienen proteínas denominadas “básicas”, debido a su alto punto isoeléctrico al ser sometidos a migración electroforética, con acciones específicas de acuerdo al tipo de proteína descrita (Gleich, 1988). La proteína mayor básica (MBP), formando el núcleo del gránulo secundario, es tóxica para parásitos, células tumorales y algunas otras células (mononucleares), pudiendo causar liberación de histamina de basófilos y mastocitos. En la matriz del gránulo secundario se encuentran dos proteínas: la catiónica (ECP) y la neurotoxina derivada del EOS (EDN), acompañada de la enzima peroxidasa (EPO); encontrándose para la ECP una acción neutralizante de la heparina, aumentando la actividad del factor XII, dañando la superficie de parásitos helmintos, siendo 10 veces más tóxica que la MBP en el daño tisular inducido por la acción de los gránulos. En tanto la EPO, se deposita en la superficie parasitaria a través de vacuolas fagocíticas, catalizando importantemente la oxidación por peróxido de hidrógeno (producido por los EOS), matando organismos como bacterias, virus, micoplasmas y hongos, induciendo adicionalmente la degranulación de mastocitos y liberación de histamina, modificando la respuesta inflamatoria, inactivando paralelamente los leucotrienos sintetizados por los propios EOS (Gleich, 1988; Center, 1991). La fosfolipasa D producida por los EOS, inactiva el PAF, siendo capaz los EOS de metabolizar el ácido araquidónico para producir leucotrienos como el leucotrieno C₄ (LTC₄), el cual juega un rol de importancia en la broncoconstricción y sobreproducción de *mucus* en pacientes asmáticos (Corrigan y Kay, 1992). Los EOS también contienen metaloproteínas capaces de degradar colageno tipo I y II, contribuyendo sustancialmente a la injuria tisular; habiéndose aislado histaminasas y arylsulfatasa B destinadas no sólo a la inactivación de la histamina producida por los

mastocitos y basófilos, sino también a la modulación en la actividad de las sustancias eosinotácticas de acción retardada, como se ha denominado a los leucotrienos C4 y D4 (Center y Randolph, 1991).

Se puede inferir, dada la evidencia existente, que los mastocitos, basófilos y EOS, potencian los procesos patológicos donde ellos se ven involucrados al autoperpetuar la inflamación en desarrollo. El efecto potenciador de los EOS está representado por la expresión de RNAm para TNF, GM-CSF, IL3, IL5, IL6 e IL8, requiriendo previamente de factores eosinopoyéticos conducentes a su propia maduración tales como GM-CSF, IL3 e IL5 (regulación autocrina). Sin embargo, los EOS comparten esta actividad estimulatoria con una inhibición simultánea de la respuesta inmune e inflamatoria (MBP, ECP y EDN inhiben la proliferación de linfocitos T) (Gleich, 1988; Spry y col., 1992).

P. EVIDENCIA DE ALGUNOS CAMBIOS INDUCIDOS POR PLOMO EN LA FUNCIÓN Y MIGRACIÓN DE LOS EOSINÓFILOS:

Las investigaciones abocadas a revelar los posibles efectos de la exposición subaguda a plomo sobre el número o degranulación de EOS son escasas. Estudios realizados en el Laboratorio de Endocrinología Experimental y Patología Ambiental (LEEPA), de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, revelaron una alteración en el recuento linfocitario sanguíneo de ratas expuestas a plomo en su vida prepuberal, señalando que esta es consecuencia probablemente de un incremento relativo de los PMN neutrófilos, más que una linfopenia real. No obstante, se encontró un recuento disminuído asociado a plomo, en los EOS no degranulados, tanto en los grupos tratados con estrógenos, como en sus respectivos controles, sugiriéndose una potenciación por plomo, en la degranulación de EOS (Villagra y col., 1997). Investigaciones posteriores demostraron una potenciación asociada a plomo, en la eosinofilia uterina inducida por estradiol, en ratas hembras expuestas a plomo en su período prepuberal, pareciendo inhibir adicionalmente la migración de EOS uterinos desde el mesometrio hacia el endometrio; no observándose ningún signo de actividad

estrogénica en las ratas expuestas a plomo sin tratamiento con estradiol (Clavero, 1999).

III. OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar, en ratas impúberes, los efectos de la exposición subaguda a sucesivas dosis de plomo, sobre la población de linfocitos y de eosinófilos en timo y bazo, y en los receptores para glucocorticoides presentes en estos órganos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Cuantificar las variaciones inducidas por bajos niveles de plomo, absorbidos durante el periodo prepuberal, en el número de linfocitos CD4+ y CD8+ de timo y bazo de ratas.

Cuantificar la eosinofilia en timo y bazo de ratas expuestas a plomo en su vida prepuberal y evaluar el grado de degranulación de los eosinófilos en ambos tejidos.

Determinar cambios cuantitativos en los receptores para glucocorticoides en timo y bazo, luego de la exposición a dosis subletales de plomo en ratas prepúberes.

IV. MATERIAL Y MÉTODO:

A. MATERIAL:

Animales: Ratas de la cepa Sprague Dowley de 7 días de edad, mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura, luz, libre acceso a comida (peletizado para ratas) y agua.

Soluciones a inyectar:

- 1-. Acetato de plomo (Merck, Darmstadt, Germany), en una concentración de 44.65 mg/mL, expresado como $Pb(C_2H_3O_2)_2$ disuelto en agua destilada, equivalente a 24.38 mg/mL de plomo.
- 2-. Hidrocortisona (Solucortef, Pharm & Upjohn, Kalamazoo, Mi, EEUU), inyectándose 18 mg por cada 100 gr. de peso vivo.
- 3-. Suero fisiológico, (cloruro de sodio 0.9%, Sanderson, Santiago, Chile).

Soluciones usadas en la incubación *in vitro*:

- 1-. Dexametasona tritiada, 1 μ Ci/mL (Amersham, Buckinghamshire, England).
- 2-. Anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína o ficoeritrina (Biosource, Camarillo, Ca, EEUU), destinados a reaccionar con los subtipos de linfocitos T CD4 y CD8 respectivamente (CD4, isotipo:IgG1, clon W 3/25; CD8, isotipo:IgG1, clon OX-8). Se reconstituyó el contenido liofilizado de los CD4, en 1 mL de solución de *buffer* fosfato (PBS), obteniendo una concentración final de 1 mg/mL, similar a la presentación original de los CD8. Posteriormente ambas soluciones de anticuerpo

fueron diluías con PBS en una proporci3n similar (1:26), obteniendo la concentraci3n efectiva con la cual se cubrieron los portaobjetos conteniendo los cortes de bazo y timo.

Tinciones usadas:

1-. Eosina, sol. acuosa (Sigma, St. Louis, Missouri, EEUU) CI: 45380.

2-. Azul de Anilina (Bayer, Leverkusen, Germany) CI: 42755.

3-. Hematoxilina (Matheson, Coleman & Bell, Cincinnati, EEUU) CI: 75290.

Soluciones fotogr3ficas para autorradiografía:

1-. Emulsi3n radioautogr3fica NTB-3 de Kodak (Rochester, NY, EEUU).

2-. Revelador Kodak (Rochester, NY, EEUU).

3-. Fijador 3cido Kodak (Rochester, NY, EEUU).

B. MÉTODO:

1. Diseño experimental:

Para la obtenci3n del n3mero de eosin3filos (EOS) presentes en bazo y timo, se dispuso de 4 grupos de ratas, de distinto n3mero cada uno, sometidos a distintas condiciones experimentales (tabla 3)

GRUPO	ÓRGANO	NÚMERO DE ANIMALES	DÍA 7 AL 19	DÍA 21
1	Bazo Timo	7 5	S/F	S/F
2	Bazo Timo	7 3	PB	S/F
3	Bazo Timo	13 8	S/F	HC
4	Bazo Timo	12 10	PB	HC

TABLA 3. Grupos de ratas usadas para la determinación del número de EOS, con sus respectivos pretratamientos (día 7 al 19) y tratamientos (día 21). S/F:suero fisiológico; Pb:plomo acetato; HC:hidrocortisona.

Para la determinación del grado de degranulación de los EOS presentes en bazo y timo, se dispuso de 4 grupo de ratas, de distinto número cada uno, sometidos a distintas condiciones experimentales, esquematizadas en la tabla 4.

GRUPO	ÓRGANO	NÚMERO DE ANIMALES	DÍA 7 AL 19	DÍA 21
1	BAZO TIMO	7 5	S/F	S/F
2	BAZO TIMO	7 5	PB	S/F
3	BAZO TIMO	13 9	S/F	HC
4	BAZO TIMO	13 12	PB	HC

TABLA 4. Grupo de ratas con sus respectivos pretratamientos y tratamientos, usados para la cuantificación del grado de degranulación de eosinófilos.

Para la cuantificación del número de linfocitos T CD4 y CD8 presentes en bazo y timo, se obtuvieron 4 grupos de 8 ratas cada uno, sometidos a diferentes condiciones experimentales (tabla 5).

GRUPO	ÓRGANO	NÚMERO DE ANIMALES	DÍA 7 AL 19	DÍA 21
1	BAZO TIMO	8 8	S/F	S/F
2	BAZO TIMO	8 8	PB	S/F
3	BAZO TIMO	8 8	S/F	HC
4	BAZO TIMO	8 8	PB	HC

TABLA 5. Grupo de ratas con sus respectivos pretratamientos y tratamientos, destinados a cuantificar el cambio en el número de linfocitos T CD4 y CD8.

El diseño considera grupos controles para el período contemplado entre los días 7 al 19 y para el tratamiento del día 21.

Los grupos inyectados con solución salina (SF) entre el día 7 al 19 (grupo 1 y 3), representan controles de los grupos inyectados con plomo durante este período (2 y 4). En tanto, los grupos 1 y 2, inyectados con SF el día 21, corresponden a controles de los grupos 3 y 4, tratados con hidrocortisona (HC) el mismo día.

El grupo 1, que recibió SF entre el día 7 al 19 y también el día 21, al ser comparado con el grupo 2 que recibió plomo como exposición crónica (7 al 19) y SF como tratamiento en el día 21, permite evidenciar el efecto del plomo sobre los parámetros evaluados en bazo y timo de ratas en su período prepuberal.

Adicionalmente, el grupo 1 representa el control al ser comparado con el grupo 3, que recibió SF entre el día 7 al 19 e HC el día 21; demostrando con esto el efecto de la HC sobre los parámetros estudiados.

Finalmente, el grupo 2, que recibió plomo y luego SF, representa el control del grupo 4, que recibe plomo y luego HC; permitiendo evaluar comparativamente el efecto del plomo con el efecto del plomo más GC, sobre los parámetros analizados.

Para la determinación semicuantitativa del número de receptores para GC presentes en bazo y timo, se sometieron a distintas condiciones experimentales dos grupos, con 4 animales cada uno, como se describe en la tabla 6.

GRUPO	ÓRGANO	NÚMERO DE RATAS	DÍA 7 AL 19	DÍA 21	INCUBACIÓN
1	BAZO TIMO	4 4	S/F	S/F	Dx-T
2	BAZO TIMO	4 4	PB	S/F	Dx-T

TABLA 6. Grupos de animales usados para la determinación semicuantitativa del número de receptores para glucocorticoides.
Dx-T:dexametasona tritiada.

Sujeto al mismo análisis descrito anteriormente, el grupo 1 al ser comparado con el grupo 2, permite evidenciar el efecto del plomo sobre la concentración de

receptores para dexametasona tritiada (Dx-T), representando el grupo 1 el control con la máxima marcación radioautográfica a obtener.

Lo caro, complicado y limitado de tiempo destinado para la realización de la técnica, no permitió disponer de un número de animales elevado por cada grupo, obviándose el conocido efecto de competencia obtenido al someter los animales a SF entre el día 7 al 19 e HC el día 21, para luego ser incubados los tejidos con Dx-T, pudiendo haber obtenido la menor marcación potencialmente presente. Sin embargo, adicionalmente a los grupos 1 y 2, se pudo destinar algunos animales, aunque en número inferior (2), para la conformación del grupo 3, recibiendo plomo como pretratamiento y luego HC el día 21, para ser incubados posteriormente con Dx-T.

Durante toda la investigación no se conoció la condición experimental a la cual pertenecía cada muestra procesada, manteniendo con ello una mayor objetividad en la interpretación de los resultados.

2. Procedimiento experimental:

Se emplearon ratas hembras mantenidas junto a sus madres, alimentadas *ad libitum* con alimento peletizado para ratas y agua potable, sometidas a condiciones controladas de luz con ciclos de 12 horas de luminosidad y 12 horas de obscuridad, bajo temperatura constante entre 23 y 26°C.

Inicialmente se inyectaron con 0.1 mL de acetato de plomo o suero fisiológico, según su condición experimental, vía inyecciones subcutáneas sucesivas, alternadas cada 72 horas, distribuidas en dosis crecientes, aumentando 0.05 mL en cada oportunidad, a partir de los 7 días de edad hasta alcanzar los 19 días, momento en el cual cada animal tratado con plomo recibió una dosis total acumulada de 24.38 mg, correspondiente a 1 mL de la solución. Después de 48 horas de la última dosis de suero fisiológico o acetato de plomo (día 21), bajo anestesia etérea, se aplicó una inyección endovenosa (yugular externa) única de suero fisiológico (SF) o 18 mg/100gr

de succinato de hidrocortisona (HC). Transcurridos 24 horas de la inyección intravenosa, se anestesiaron los animales con gas eter, extrayendo muestra completa de timo y bazo, seleccionando tejido para fijación en formalina neutra al 10%, deshidratación e inclusión en parafina, para luego realizar cortes histológicos seriados. Posteriormente se sometieron los cortes dispuestos en portaobjetos, a tinción con eosina y luego con azul de anilina, evidenciando los granulos presentes en el citoplasma de los eosinófilos a través de la fluorescencia registrada por el microscopio (fotografías 1 a 5).

Paralelamente, muchas de las muestras obtenidas fueron desparafinadas y posteriormente incubadas con anticuerpos monoclonales destinados a reconocer los linfocitos T CD4 y CD8, siendo guardados por 24 horas bajo obscuridad total en cámara húmeda para luego lavarse con agua destilada, teñidos con eosina acuosa al 0.5% y cubiertos con una solución compuesta de 80% glicerol y 20% PBS (*buffer* fosfato), sometiendo finalmente, luego de 24 horas, a un análisis cualitativo bajo microscopía de fluorescencia (fotografías 6, 7, 12 y 13).

Adicionalmente, en el momento de la toma de muestra de bazo y timo, se recolectó en tubos Eppendorf conteniendo EDTA, 0.5 0 1 mL de sangre vía caudotomía, enviándose los tubos al Instituto de Salud Pública de Chile, para la detección de los niveles de plomo en sangre por espectrometría de absorción atómica.

La dosis de acetato de plomo se determinó correlacionando los miligramos de plomo inyectado con los niveles sanguíneos de plomo obtenidos, observándose niveles de plomo en sangre inferiores a las máximas aceptables en adultos por la norma chilena ocupacional vigente al momento de iniciar el estudio (50 $\mu\text{g}/\text{dL}$) y alrededor de la norma chilena actualmente vigente (40 $\mu\text{g}/\text{dL}$).

Para demostrar el efecto de las condiciones experimentales sobre el número de receptores para GC presentes en bazo y timo, se sometieron ratas a las mismas condiciones de manejo y esquema de inyecciones descritas; transcurridas 24 horas,

luego de la aplicación endovenosa de SF o HC, se tomaron muestras completas de bazo y timo, seleccionando tejido fraccionado de cada órgano para incubación *in vitro/ex vivo* con 20 mL de dexametasona tritizada durante 1 hora a 37°C, lavándolas posteriormente con SF y congelando los tejidos radiomarcados, en propano líquido enfriado en nitrógeno líquido a -180°. De cada muestra, secciones de 6 µm fueron obtenidos en el criostato, deshidratándose luego las muestras al vacío a través de una criobomba a -35° durante 24 horas. Cada corte congelado y secado al vacío, fue montado sobre un portaobjeto impregnado con emulsión radiográfica seca (cuarto oscuro), obteniendo 6 radioautogramas (c/u conteniendo 10 secciones de tejido) de cada muestra realizada por animal. Luego de la exposición de la película radioautográfica a la radioactividad de los cortes, desde el primer mes y en los meses sucesivos, fueron revelados por 35 a 75 segundos, fijados en fijador ácido por 10 minutos, lavados en agua y posteriormente teñidos con hematoxilina/eosina, para análisis con microscopía óptica convencional.

3. Procedimiento de evaluación:

El número total de leucocitos eosinófilos (EOS) presentes en bazo y timo, fue evaluado realizando recuento microscópico directo, con microscopio de epifluorescencia (MF), usando filtro verde (EX: 510-560 nm - DM: 575 nm - BA: 590 nm), bajo aumento de 200, seleccionando la mayor cantidad posible de campos microscópicos al azar por cada corte elegido en forma alternada al corte adyacente.

Para la estimación del grado de degranulación de los EOS, se uso MF usando filtro verde, conectando el microscopio a una cámara fotográfica conectada a su vez a un computador, procesando las imágenes fotografiadas y grabadas de cada EOS, a través del programa Photoshop 3.0, realizando posteriormente morfometría computarizada (fotografías 8 a 11).

Los cortes histológicos de bazo y timo sometidos a inmunofluorescencia directa (IF), se evaluaron de la misma forma descrita para la cuantificación del número de EOS, asignando a cada animal un número (1 a 4) de acuerdo a la

impresión según la cantidad de puntos fluorescentes correspondientes a los linfocitos CD4 y CD8.

Microscopía óptica fue usada para evaluar las marcas radioautográficas presentes en las células de timo y bazo, recorriendo los cortes histológicos bajo aumento de 200 y luego asignando a cada animal un número (1 a 4) de acuerdo a la cantidad de puntos detectados.

4. Análisis estadístico:

La variabilidad de la eosinofilia tisular y el grado de degranulación de leucocitos eosinófilos, para las distintas condiciones experimentales, se evaluaron a través de un análisis de varianza (ANOVA) con un $p < 0.05$, usando posteriormente la prueba de las mínimas diferencias estadísticas (LSD) en el caso de existir diferencias estadísticamente significativas luego de la aplicación del ANOVA. Se aplicó el test de Chavuenet en los casos que se encontró necesario.

Tanto el número de linfocitos T presentes en los tejidos linfoides, como el número total de marcas radioautográficas celulares, se sometieron a la dócima de Kruskal-Wallis con un grado de significancia del 5%, detectando las posibles diferencias derivadas de las condiciones experimentales. Posteriormente en el caso de encontrar alguna diferencia estadísticamente significativa, se sometieron los diferentes grupos experimentales, a la prueba de Mann-Whitney de una cola, para determinar entre que condiciones experimentales existe diferencia.

El nivel de significancia de las diferencias encontradas, se representan en los gráficos con asteriscos, correspondiendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Las condiciones experimentales que se compararon por considerarse válidas desde el punto de vista biológico, en todos los parámetros estudiados, fueron:

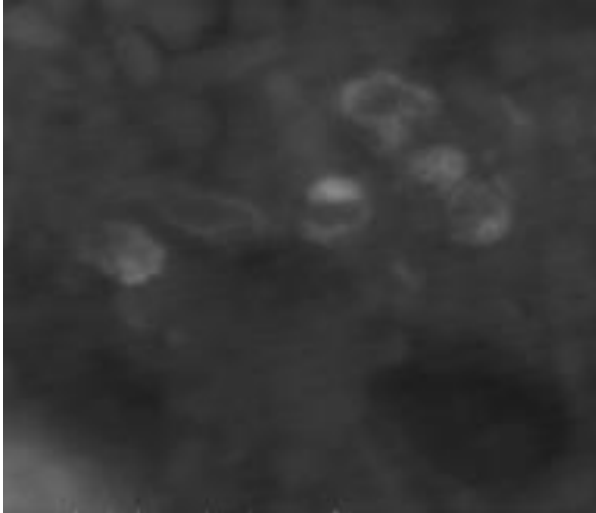
–Suero fisiológico (SF) (exposición) - suero fisiológico (tratamiento final) con plomo (Pb) - SF.

–SF - SF con SF - hidrocortisona (HC).

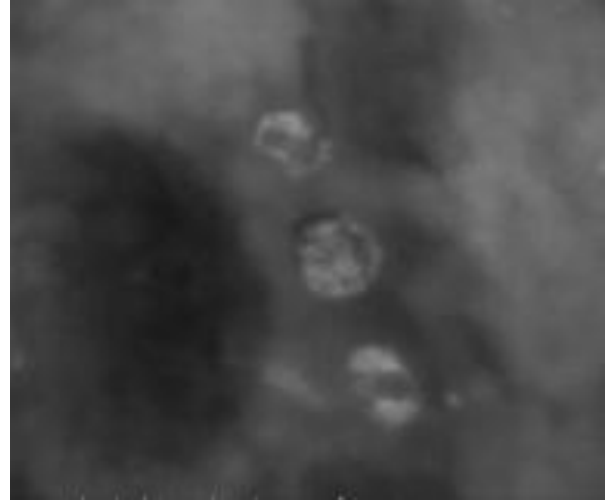
–Pb - SF con Pb - HC.

–Grupos con HC - grupos sin HC.

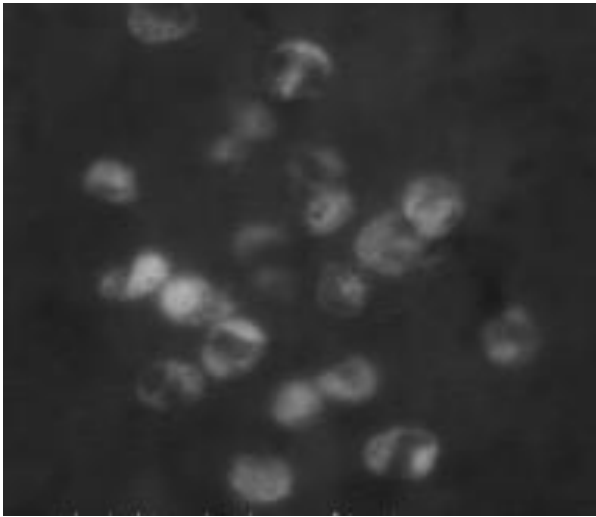
–Grupos con Pb - grupos sin Pb.



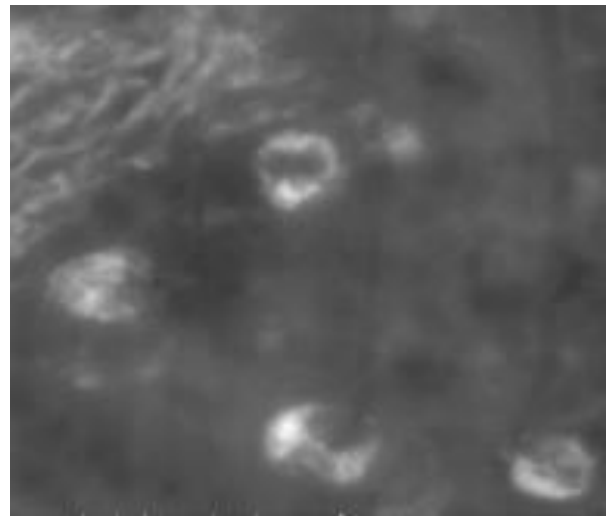
Fotografía 1. Eosinófilos de bazo degranulados, demostrado por la escasa cantidad de gránulos fluorescentes. 40X. Microscopio epifluorescente (MF).



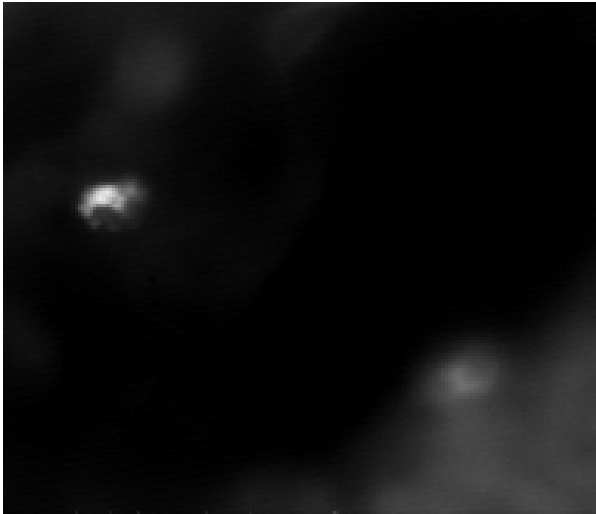
Fotografía 2. Eosinófilos con escasa cantidad de gránulos, alrededor de un sinusoide esplénico. Imágenes obtenidas luego de la fotografía y el procesamiento computacional.



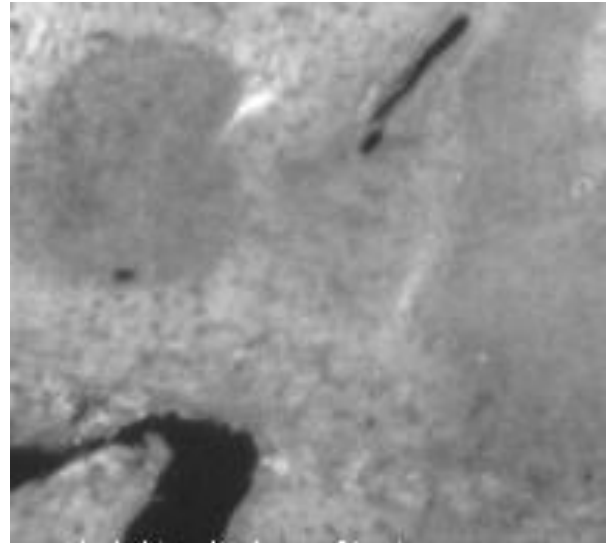
Fotografía 3. Eosinófilos tímicos agrupados, medianamente granulados.



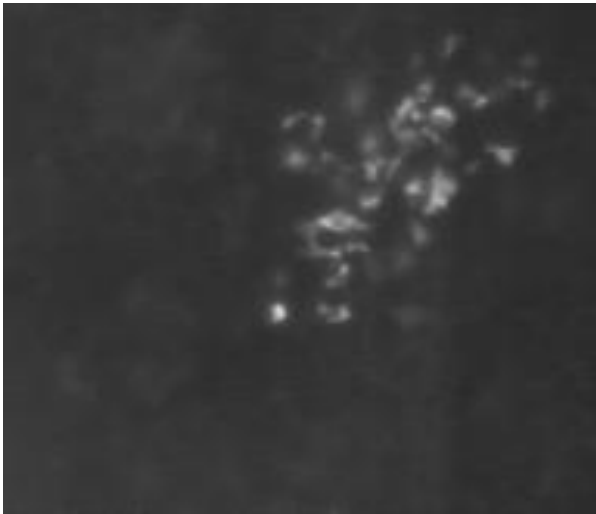
Fotografía 4. Eosinófilos de bazo intensamente granulados.



Fotografía 5. Eosinófilo tímico aislado. Se observa la presencia de abundantes gránulos densamente fluorescentes alrededor de un núcleo excéntrico y libre de fluorescencia.



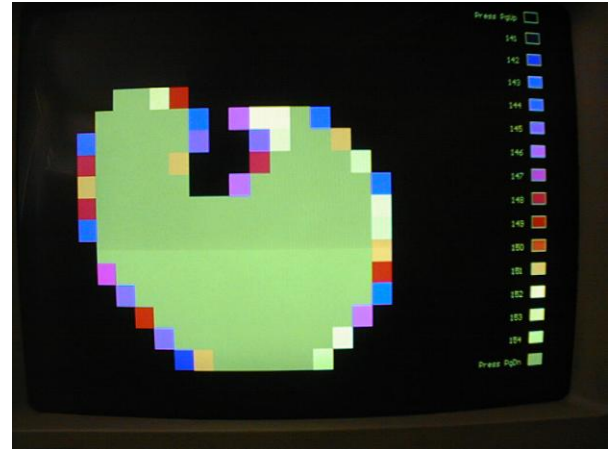
Fotografía 6. Apariencia de la región corticomedular de timo. 10X. MF.



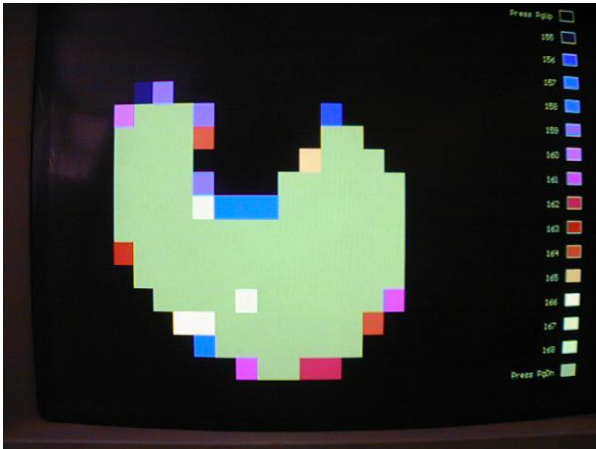
Fotografía 7. Vista panorámica (20X) mostrando la presencia de abundantes linfocitos en timo de rata prepúber, producto de la unión con anticuerpos fluorescentes.



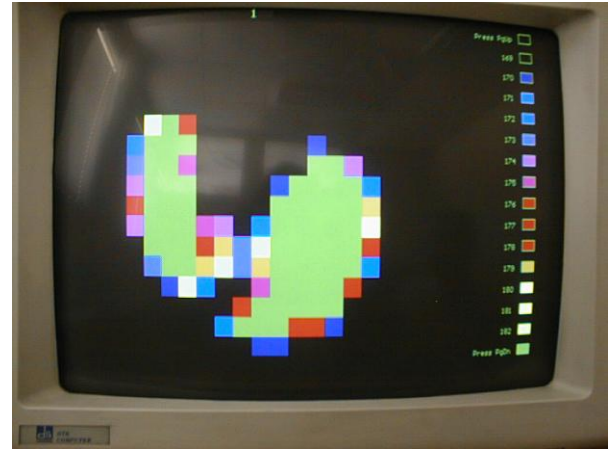
Fotografía 8. Imágen computacional de un eosinófilo aislado, fotografiado y sometido a morfometría computarizada. La apariencia cuadriculada corresponde a la división realizada por el programa computacional (pixeles), asignando simultáneamente un color de acuerdo a la intensidad de fluorescencia captada por la cámara unida al microscopio.



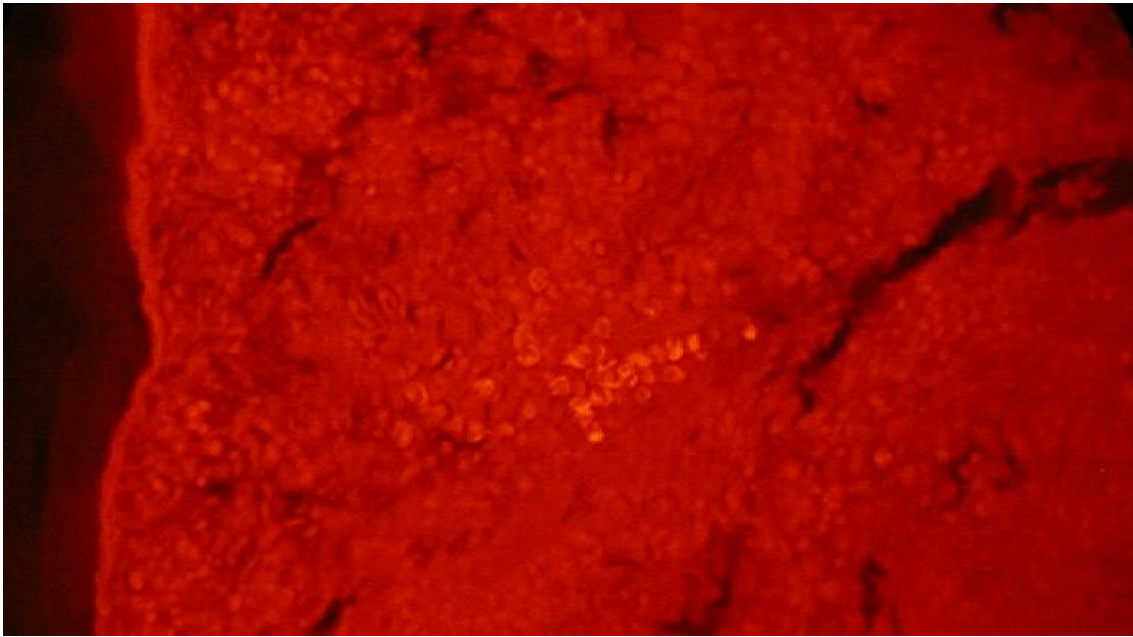
Fotografía 9. Imágenes del eosinófilo mostrado en la fotografía anterior, demostrando el procesamiento realizado, en el cual se va seleccionando por exclusión, según la escala de fluorescencia los gránulos citoplasmáticos con los cuales se va a trabajar.



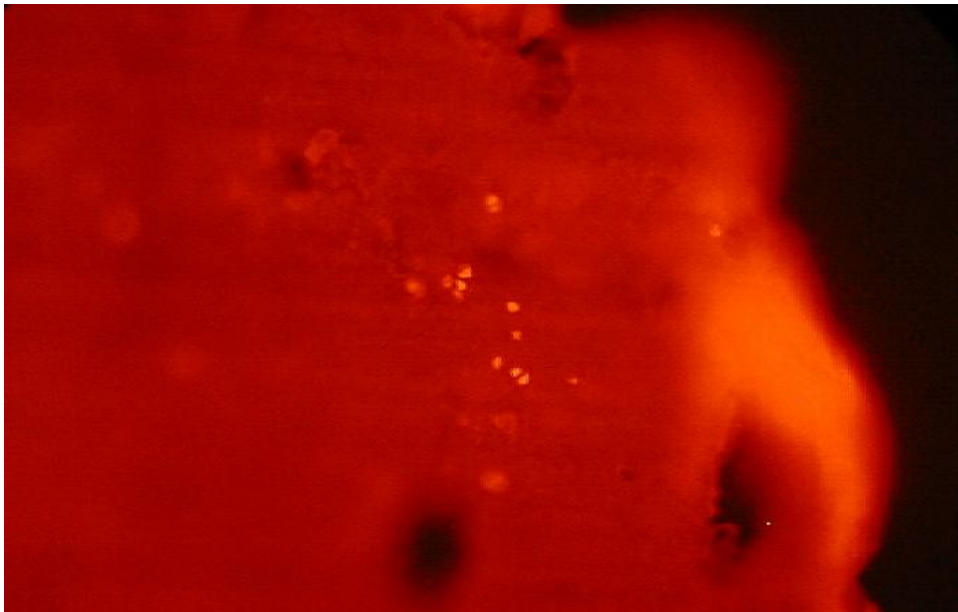
Fotografía 10. El color verde corresponde a los gránulos con mayor contenido de proteínas que fluorescen con la eosina y el azul de anilina, analizadas bajo el filtro IV y según la longitud de onda seleccionada.



Fotografía 11. Fotografía correspondiente a la pantalla del computador, mostrando la imagen final seleccionada por el operador con la cual el programa analizará el área y volumen ocupados por los gránulos con distinta intensidad luminosa, presentes en este leucocito eosinófilo. La presencia del núcleo (de ubicación polar) está determinada por la ausencia de elementos fluorescentes relevantes.



Fotografía 12. Linfocitos T CD4 (*helper*) fluorescentes detectados por anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína. El patrón de distribución tiende a ser subcortical, estando frecuentemente agrupados en racimo. La imagen corresponde a timo de ratas no expuestas a plomo durante su vida prepupal.



Fotografía 13. Escasa cantidad de linfocitos T CD4 (*helper*) ubicados en timo de ratas impúberes expuestas a plomo. Pareciendo eosinófilos densamente granulares compactados, los linfocitos T CD4 y CD8 (citotóxicos) presentan una apariencia brillante y compactada, no siendo relacionadas estas dos características con alguna condición experimental en especial.

V. RESULTADOS:

A. Número de eosinófilos en bazo:

Luego de la aplicación del análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de las mínimas diferencias estadísticas (LSD), se encontró que en los animales expuestos a plomo (Pb) y tratados con suero fisiológico (SF), el número de eosinófilos (EOS) no fue significativamente diferente al obtenido en los animales expuestos y tratados con SF.

Sin embargo, como lo representa el gráfico 1, la condición experimental expuesta a Pb y tratada con SF, demostró un recuento de EOS significativamente superior al grupo expuesto a Pb y tratado con hidrocortisona (HC), $p < 0.05$.

Adicionalmente, el grupo que recibió SF como exposición y tratamiento, reveló un mayor recuento de EOS al ser comparado con los animales que recibieron SF y luego fueron tratados con HC, $p < 0.05$ (gráfico 1).

Conjuntamente, al ser comparados los grupos que recibieron o no HC como tratamiento, luego de la aplicación del ANOVA de doble entrada, se pudo evidenciar una significativa disminución en el número de EOS en los animales tratados con HC, $p: 0.002$; no evidenciándose este resultado en el caso del plomo.

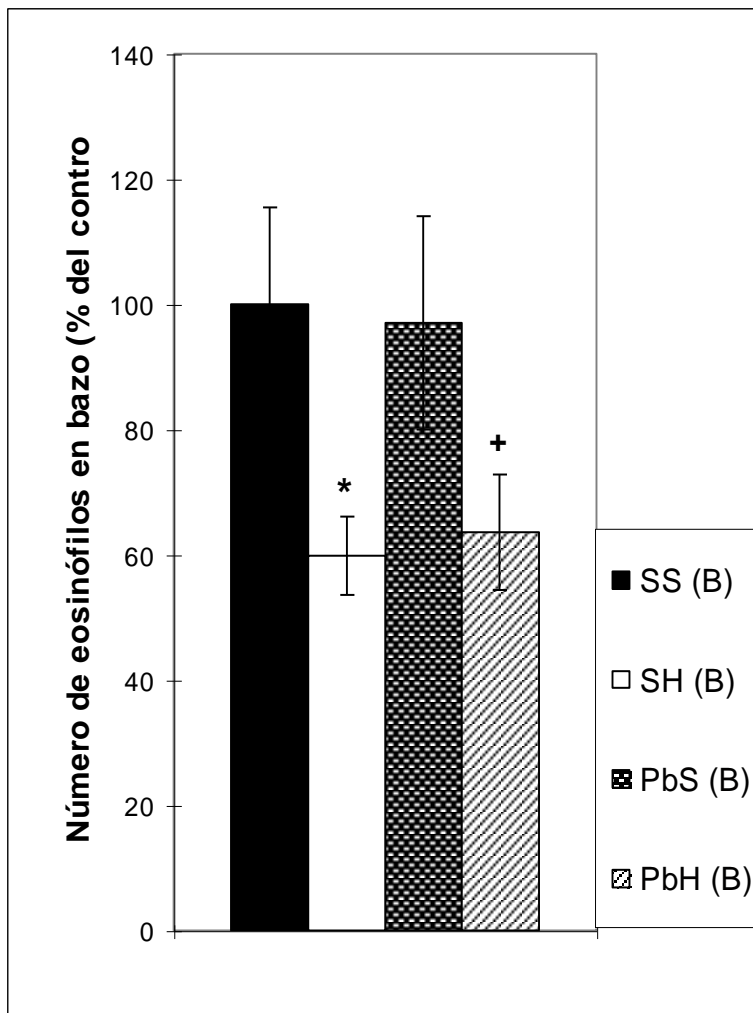


GRÁFICO 1. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona sobre el número total de eosinófilos esplénicos en ratas impúberes. Los animales fueron tratados con suero fisiológico (S), hidrocortisona (H), plomo (Pb) o las combinaciones posibles propuestas en el diseño experimental. Se utilizó análisis de varianza, usando posteriormente el test de las mínimas diferencias estadísticas (LSD). Existe diferencia significativa + $p < 0.05$, al comparar el grupo expuesto a Pb y tratado con H, en relación al grupo expuesto a Pb y tratado con S. * $p < 0.05$, indica diferencia estadísticamente significativa, entre el grupo expuesto a S y tratado con H, en relación a su grupo control, expuesto y tratado con S. La ausencia de signos significa que no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

B. Número de eosinófilos en timo:

Luego del análisis de las distintas condiciones experimentales, no se apreció diferencias significativas producto de algún tratamiento o exposición (gráfico 2).

Se pudo observar, sin embargo, al ser comparados los grupos que fueron expuestos o no a plomo en forma subaguda, luego de la aplicación del ANOVA de doble entrada, una disminución en el número de EOS en los animales que recibieron plomo, con un $p: 0.051$; no siendo encontrado este resultado en el caso de la HC.

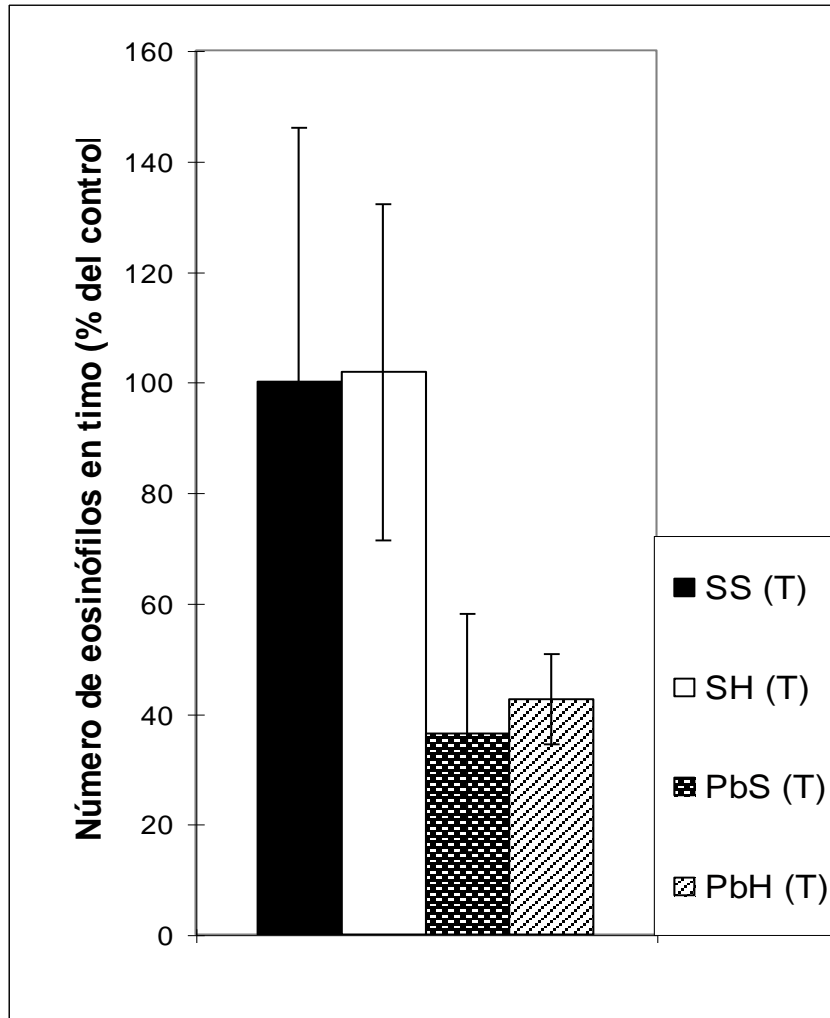


GRÁFICO 2. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona sobre el número total de eosinófilos tímicos en ratas impúberes. Los animales fueron tratados con suero fisiológico (S), hidrocortisona (H), plomo (Pb) o las combinaciones posibles propuestas en el diseño experimental. Se utilizó análisis de varianza, usando posteriormente el test de las mínimas diferencias estadísticas (LSD). La ausencia de signos significa que no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

C. Volumen y área de eosinófilos en bazo:

El gráfico 3 muestra la existencia de una disminución en el área y volumen total de EOS en el grupo expuesto a plomo y luego tratado con SF, en relación a su control (SF-SF), ANOVA, LSD, $p < 0.05$. (fotografías 14 a 19 y 22, 23).

Adicionalmente, el grupo expuesto a plomo pero luego tratado con HC, demostró un área y volumen total de EOS significativamente superior al registrado en el grupo expuesto a plomo y tratado con SF, $p < 0.05$.

En relación al área y volumen ocupados por los gránulos de menor luminosidad, el grupo expuesto a plomo y tratado con SF reveló un resultado estadísticamente inferior al ser comparado con su control (SF/SF), $p < 0.05$ (gráfico 4).

El área y volumen de los gránulos menos luminosos del grupo expuesto a plomo y tratado con SF, es significativamente inferior al de los animales expuestos a plomo y tratados con HC, $p < 0.05$.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el área y volumen total, y de gránulos de menor luminosidad, entre los animales expuestos y tratados con SF y el grupo expuesto a SF y tratado posteriormente con HC.

No fueron halladas diferencias significativas al comparar el volumen y área gránulos con mediana e intensa luminosidad de EOS esplénicos, a través de todas las condiciones experimentales analizadas.

Luego de la aplicación del ANOVA de doble entrada, no se observó diferencia significativa, al ser comparados los grupos que fueron expuestos o no a plomo en forma subaguda.

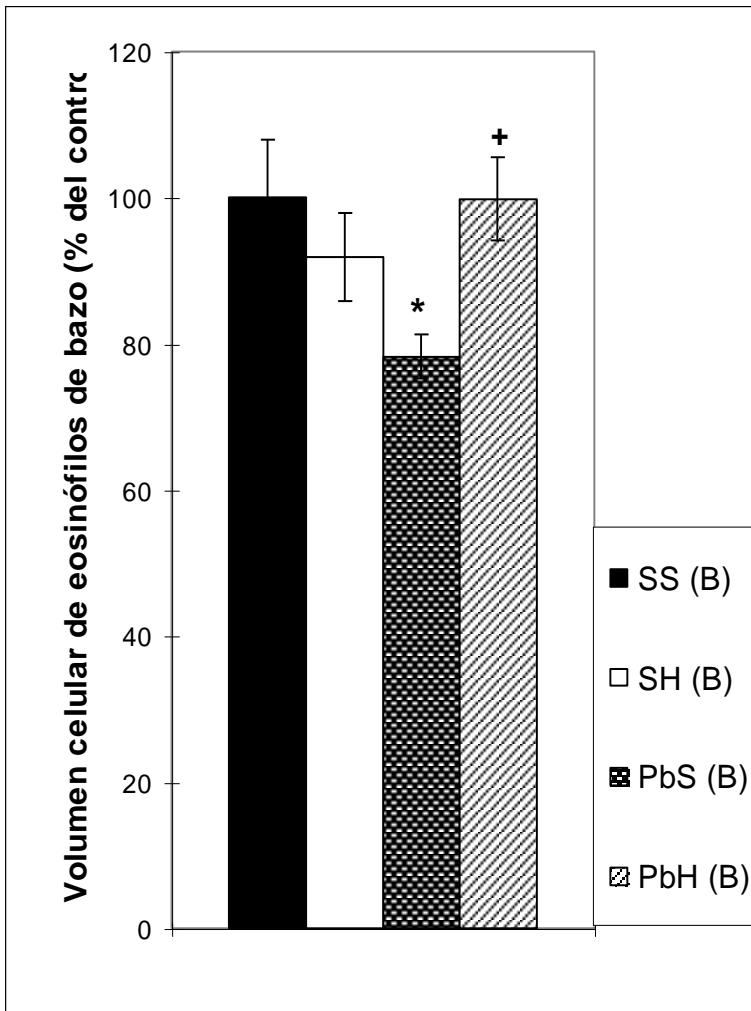


GRÁFICO 3. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona sobre el volumen de eosinófilos esplénicos en ratas impúberes. Los animales fueron tratados con suero fisiológico (S), hidrocortisona (H), plomo (Pb) o las combinaciones posibles propuestas en el diseño experimental. Se utilizó análisis de varianza, usando posteriormente el test de las mínimas diferencias estadísticas (LSD). + $p < 0.05$, indica diferencia estadísticamente significativa al comparar el grupo expuesto a Pb y tratado con H, en relación al grupo expuesto a Pb y tratado con S. * $p < 0.05$, indica diferencia estadísticamente significativa, entre el grupo expuesto a Pb y tratado con S, en relación a su grupo control, expuesto y tratado con S. La ausencia de signos significa que no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

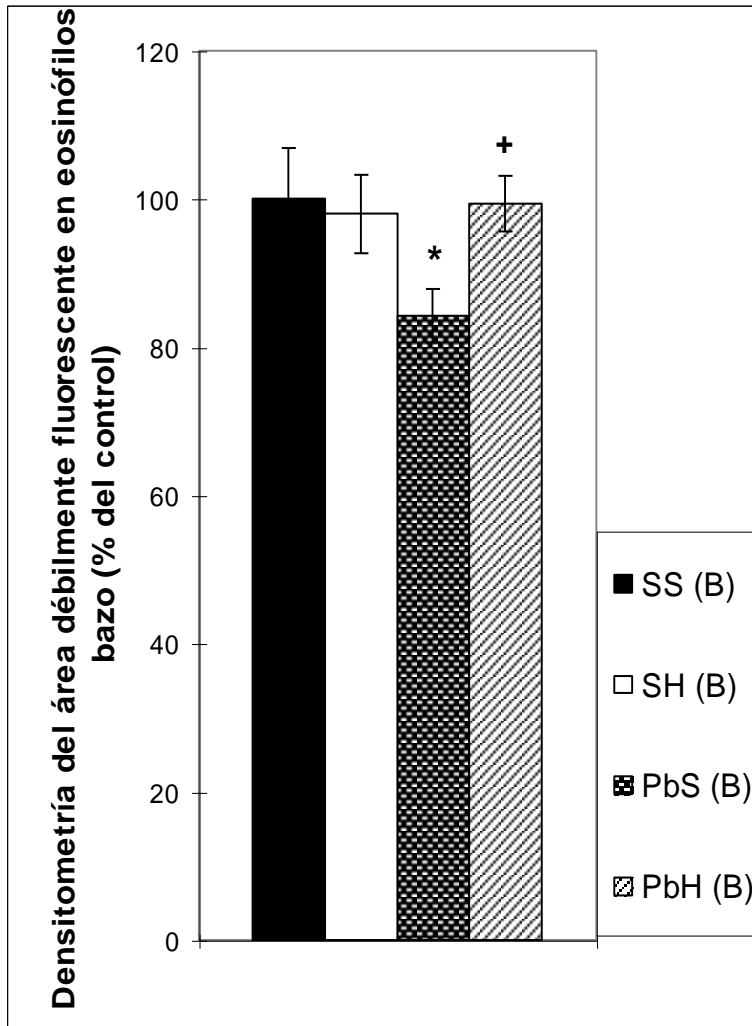


GRÁFICO 4. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona, sobre la densidad ocupada por gránulos menos luminosos en leucocitos eosinófilos esplénicos de ratas impúberes. Los animales fueron tratados con suero fisiológico (S), hidrocortisona (H), plomo (Pb) o las combinaciones posibles propuestas en el diseño experimental. Se utilizó análisis de varianza, usando posteriormente el test de las mínimas diferencias estadísticas (LSD). + $p < 0.05$, indica diferencia estadísticamente significativa al comparar el grupo expuesto a Pb y tratado con H, en relación al grupo expuesto a Pb y tratado con S. * $p < 0.05$, indica diferencia estadísticamente significativa, entre el grupo expuesto a Pb y tratado con S, en relación a su grupo control, expuesto y tratado con S. La ausencia de signos significa que no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

D. Volumen y área de eosinófilos en timo:

Luego del análisis estadístico, no se encontró ninguna diferencia significativa inducida por la exposición a plomo o la aplicación de HC (gráfico 5 y 6).

No obstante, se demostró un volumen y área total de EOS tímicos inferior a la encontrada en los EOS esplénicos, revelando un mayor tamaño de los EOS de bazo en relación a los EOS de timo (fotografías 20, 21 y 24, 25).

Complementariamente, el volumen y área cubierta con gránulos de mayor luminosidad, fue superior en los EOS tímicos en relación a los EOS de bazo.

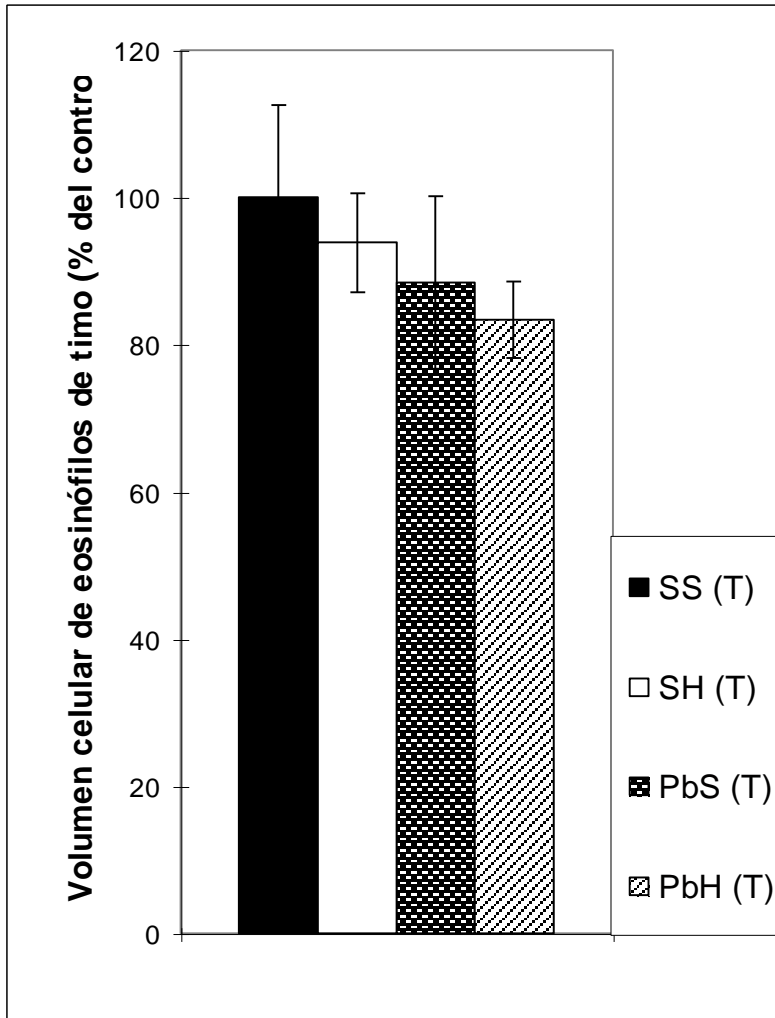


GRÁFICO 5. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona sobre el volumen de eosinófilos tímicos en ratas impúberes. Los animales fueron tratados con suero fisiológico (S), hidrocortisona (H), plomo (Pb) o las combinaciones posibles propuestas en el diseño experimental. Se utilizó análisis de varianza, usando posteriormente el test de las mínimas diferencias estadísticas (LSD). La ausencia de signos significa que no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

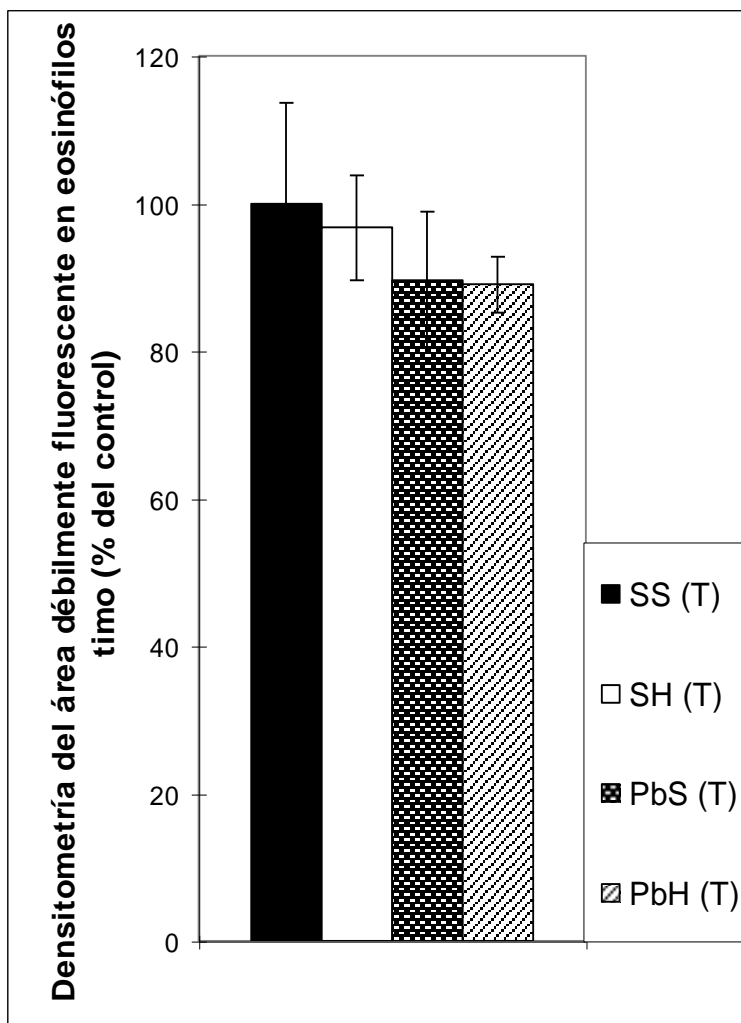


GRÁFICO 6. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona, sobre la densidad ocupada por gránulos menos luminosos en leucocitos eosinófilos tímicos de ratas impúberes. Los animales fueron tratados con suero fisiológico (S), hidrocortisona (H), plomo (Pb) o las combinaciones posibles propuestas en el diseño experimental. Se utilizó análisis de varianza, usando posteriormente el test de las mínimas diferencias estadísticas (LSD). La ausencia de signos significa que no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

E. Número de linfocitos CD4 en tino:

El test de Kruskal-Wallis (K-W) reveló diferencias estadísticamente significativas, expresando algún efecto derivado de los distintos tratamientos aplicados, tanto para un nivel de significancia de $p < 0.05$ como para $p < 0.01$. Luego de la corrección del test (K-W corregido), esta diferencia se mantuvo para ambos niveles de significación.

El test de Mann-Whitney de una cola, reveló una disminución significativa en el número de CD4, producto de la exposición subaguda a plomo en relación a su grupo control (SF-SF), $p < 0.05$; no demostrándose algún efecto significativo entre las otras comparaciones evaluadas (SF-SF v/s SF-HC, Pb-SF v/s Pb-HC) (gráfico 7).

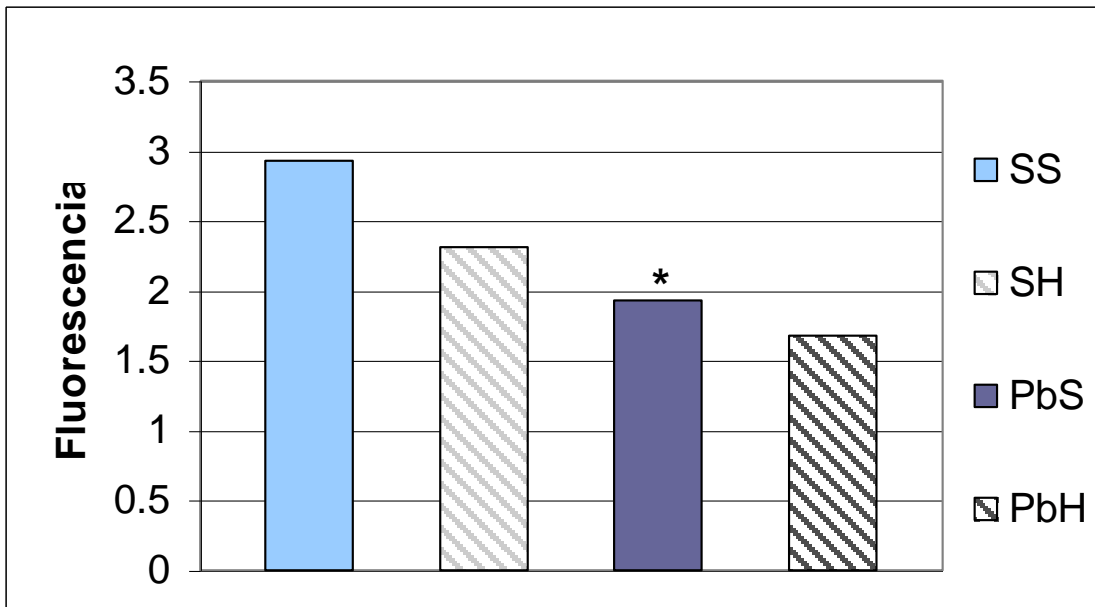


GRÁFICO 7. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona, sobre el número total de linfocitos T CD4 presentes en timo de ratas impúberes. Los animales fueron tratados con suero fisiológico (S), hidrocortisona (H), plomo (Pb) o las combinaciones posibles propuestas en el diseño experimental. Luego del análisis estadístico (prueba de Kruskal-Wallis / Mann-Whitney) se comprobó la existencia de diferencia significativa * $p < 0.05$, al comparar el grupo expuesto a plomo y tratado con solución salina en relación a su grupo control, expuesto y tratado con suero fisiológico.

F. Número de linfocitos CD8 en timo:

Tanto para un nivel de significancia de $p < 0.05$ como para $p < 0.01$, el H-Test reveló diferencias significativas, expresando algún efecto derivado de los distintos tratamientos aplicados. Esta diferencia se mantuvo para ambos niveles de significación, luego de la aplicación del H-test corregido.

El test de Mann-Whitney de una cola, reveló una disminución significativa en el número de linfocitos T CD8 en los grupos expuestos a plomo en comparación con su correspondiente control (SF-SF), $p < 0.05$; señalando además una disminución de significancia estadística, en los linfocitos T CD8 producto de la aplicación de HC (SF-SF v/s SF-HC), $p < 0.05$; no encontrando ningún efecto significativo en la otra comparación estudiada (Pb-SF v/s Pb-HC) (gráfico 8).

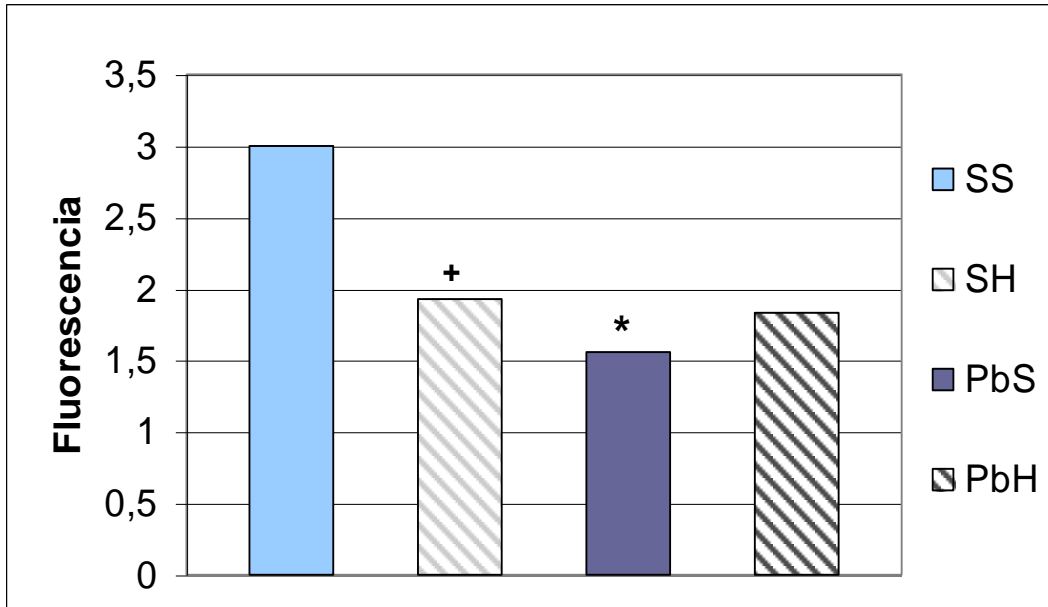


GRÁFICO 8. Efecto de la exposición a plomo por dos semanas y del tratamiento posterior con hidrocortisona, sobre el número total de linfocitos T CD8 presentes en timo de ratas impúberes. Los animales fueron tratados con suero fisiológico (S), hidrocortisona (H), plomo (Pb) o las combinaciones posibles propuestas en el diseño experimental. Luego del análisis estadístico (prueba de Kruskal-Wallis / Mann-Whitney) se comprobó la existencia de diferencia significativa * $p < 0.05$, al comparar el grupo expuesto a Pb y tratado con S en relación a su grupo control, expuesto y tratado con S.

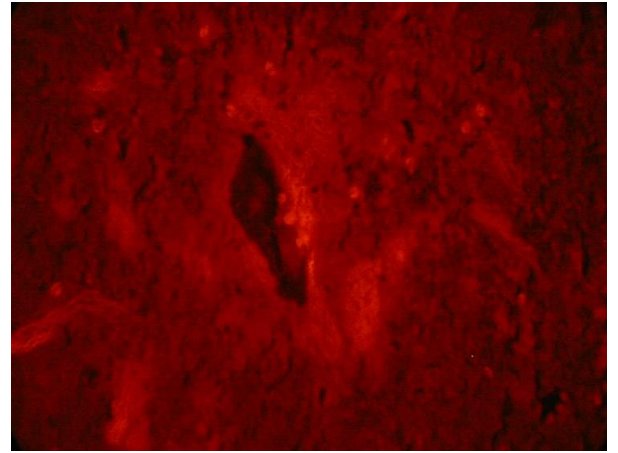
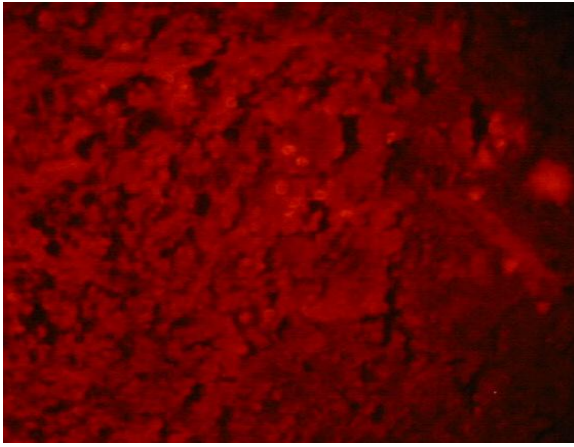
+ $p < 0.05$, indica diferencia estadísticamente significativa, entre el grupo expuesto a S y tratado con H, en relación al grupo expuesto y tratado con S.

G. Número de linfocitos CD4 y CD8 en bazo:

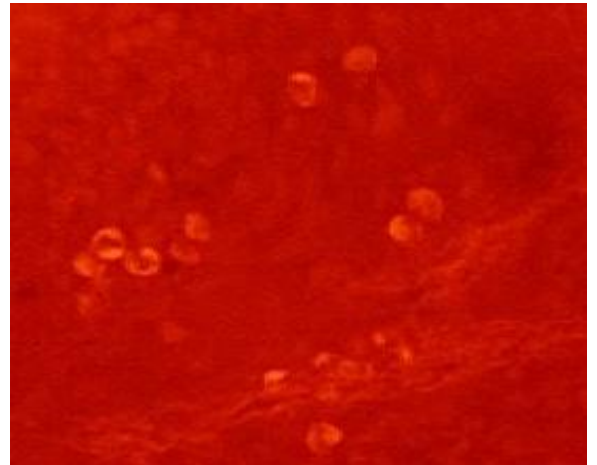
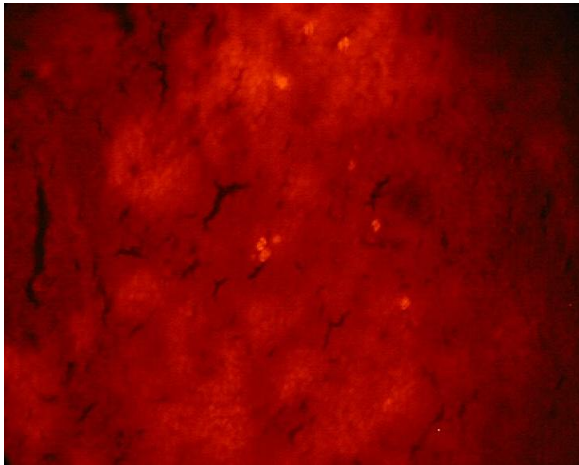
No se detectó marcación fluorescente en ningún corte de bazo luego de la aplicación de la técnica descrita anteriormente.

H. Número de marcas radioautográficas:

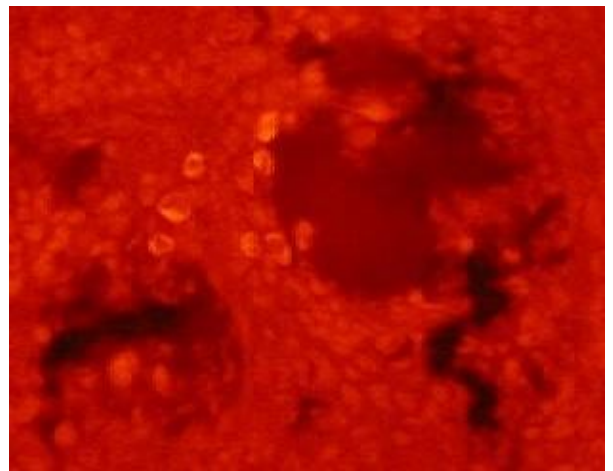
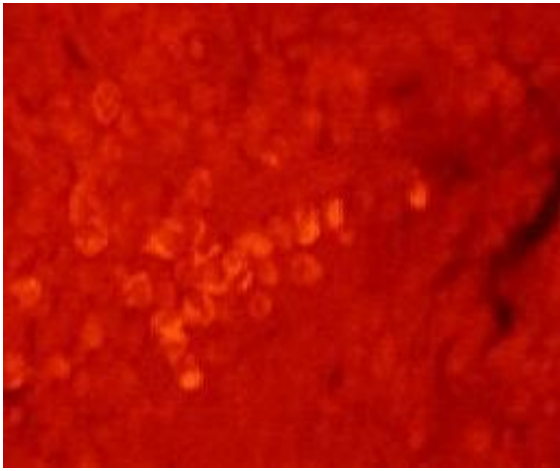
Luego del análisis estadístico, no se detectaron diferencias significativas inducidas por la exposición a plomo o el tratamiento con HC, en ninguno de los grupos estudiados (fotografía 26). No obstante, existió una tendencia estadísticamente no significativa, a la disminución en el número de receptores en los grupos expuestos a plomo.



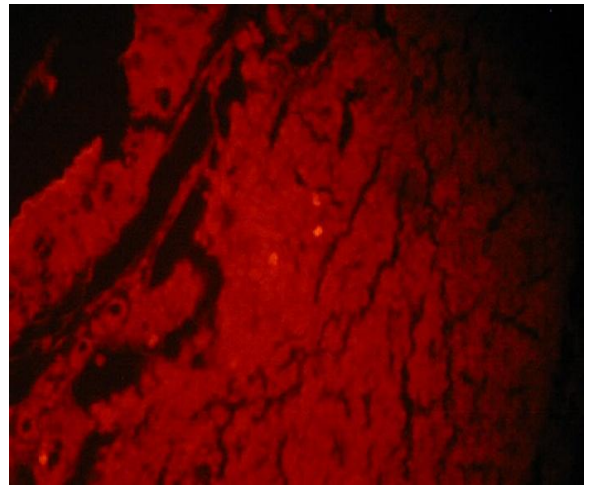
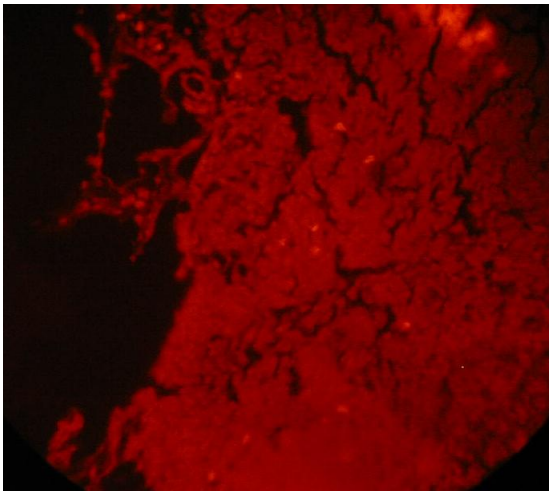
Fotografías 14 y 15. Eosinófilos de bazo mostrando una distribución perisinusoidal y moderada a leve intensidad luminosa. Microscopia de epifluorescencia, filtro verde (EX: 510-560 nm - DM: 575 nm - BA: 590 nm), 20X. Esta apariencia corresponde al aspecto más corriente de eosinófilos en animales expuestos a plomo durante su vida prepuberal.



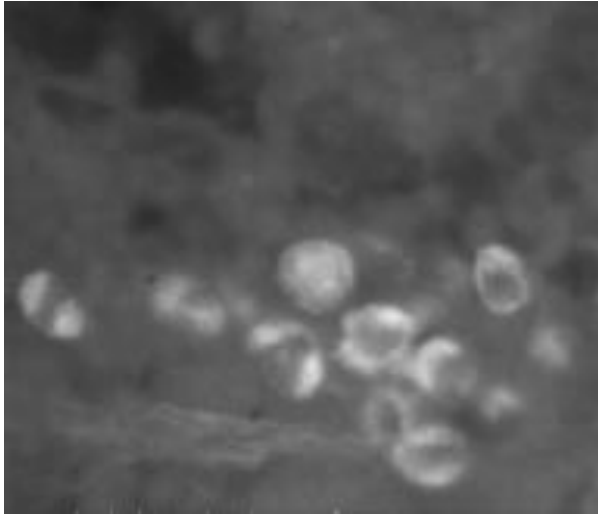
Fotografías 16 y 17. Eosinófilos esplénicos de ratas del grupo control (expuestas y tratadas con suero fisiológico). Se observan una moderada cantidad de eosinófilos con densidad luminosa intensa, correspondiente a los gránulos citoplasmáticos teñidos con eosina-azul de anilina vistos con microscopia de epifluorescencia, filtro verde, 20X y 40X respectivamente.



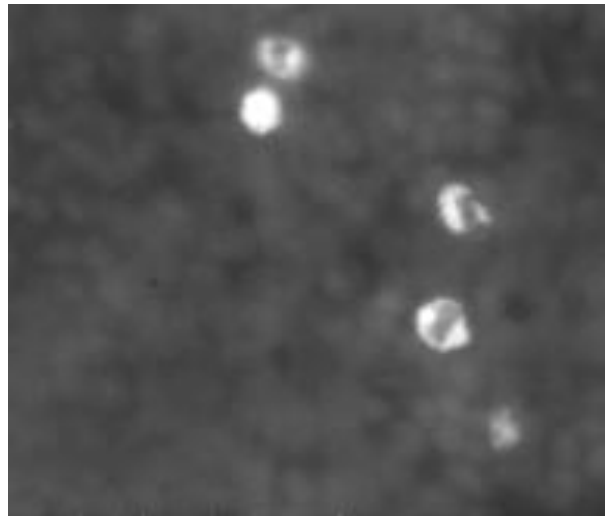
Fotografías 18 y 19. Eosinófilos esplénicos intensamente fluorescentes, demostrando una gran cantidad de gránulos. Se observa una aglomeración (aparición en racimo) en la foto derecha. La luminosidad observada corresponde a la apariencia comúnmente descrita en los animales expuestos y tratados finalmente con suero fisiológico. (40X).



Fotografías 20 y 21. Cortes de timo, mostrando la apariencia frecuentemente observada de eosinófilos tímicos, caracterizados por ser de menor tamaño y de mayor luminosidad al ser comparados con los eosinófilos esplénicos (20 X).



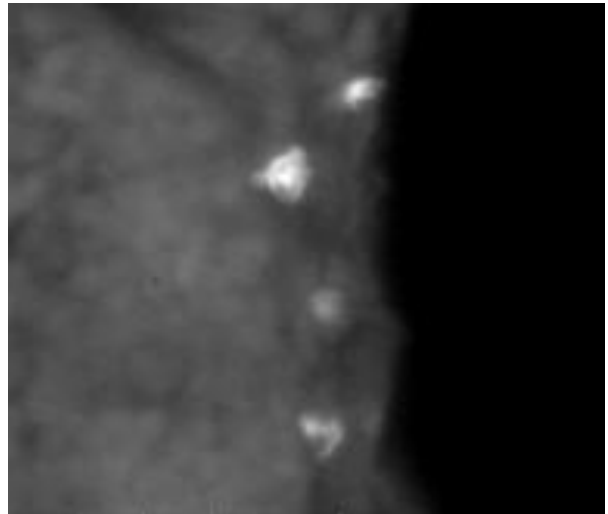
Fotografía 22. Conglomerado de eosinófilos esplénicos medianamente granulares. (40 X).



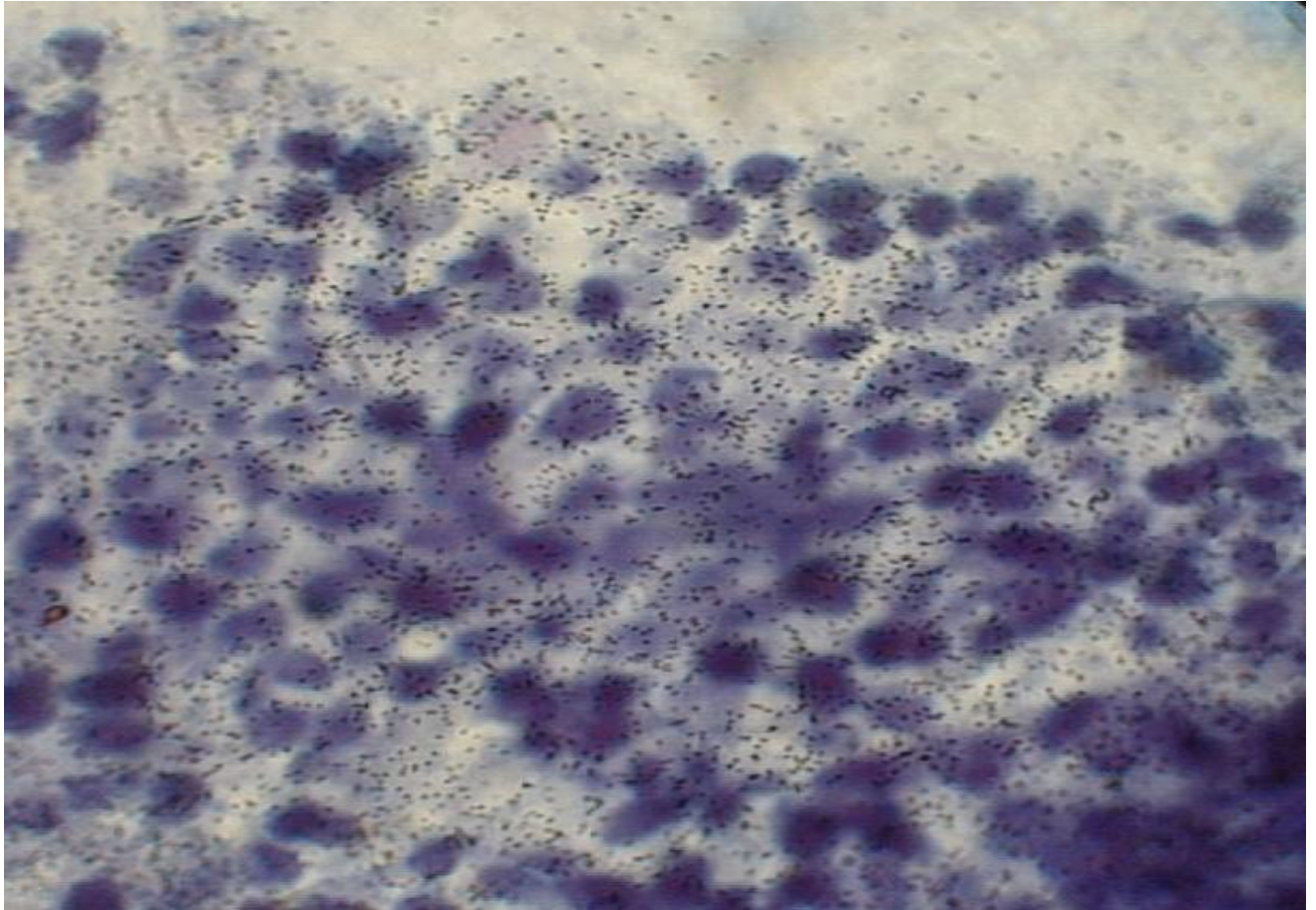
Fotografía 23. Eosinófilos de bazo con abundante cantidad de gránulos intracitoplasmáticos muy fluorescentes. (40 X).



Fotografía 24. Eosinófilos de timo, pequeños y moderadamente granulares (40 X).



Fotografía 25. Pequeños eosinófilos brillantes y compactos en corteza de timo (aparición usual) (40 X).



Fotografía 26. Ampliación correspondiente a corte histológico de bazo, mostrando la numerosa presencia de receptores para glucocorticoides, demostrado por la cantidad de puntos radioautográficos visibles al microscopio óptico. 100 X. Hematoxilina-eosina.

VI. DISCUSIÓN:

A. Radioautografía:

Los resultados del presente trabajo no nos permiten detectar diferencias estadísticamente significativas de los receptores (R) para glucocorticoides (GC) en bazo y timo entre las distintas condiciones experimentales. No obstante, también es posible inferir bajo los resultados obtenidos, la persistencia en el número y/o afinidad de la dexametasona por los R para GC presentes en las ratas en su etapa prepuberal, aún en presencia de una exposición subaguda a bajos niveles de plomo.

B. Inmunofluorescencia (población de linfocitos T *helper* y citotóxicos):

La disminuida cantidad de fluorescencia observada en los grupos expuestos a plomo, correspondiente a una menor concentración de linfocitos T CD4 y CD8 presentes en timo, puede explicarse por un efecto directo e indirecto del plomo sobre la supervivencia celular, función y/o regulación del sistema inmune.

La disminuida cantidad de linfocitos T CD4 y CD8 asociada a la exposición a plomo, puede explicarse indirectamente por su efecto sobre los glucocorticoides endógenos. En efecto, se conoce la capacidad del plomo para alterar, tanto el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, como el sistema nervioso central y periférico, encontrándose niveles de catecolaminas y cortisol circulantes elevados en ratas hembras expuestas a plomo (Vysocil y col., 1991), provocando hiperactividad del sistema nervioso simpático y disminuyendo los R β -adrenérgicos de origen vascular (Carsia y col., 1995). Por ello, es posible aventurar que los mayores niveles de GC plasmáticos inducidos por plomo, alteran el número total y las subpoblaciones de linfocitos circulantes en las ratas prepúberes, bloqueando la producción de IL1 por macrófagos, la cual inhibe directamente la producción de proopiomelanocortina (POMC) derivada de linfocitos B, causando además, no sólo una disminución en la

proliferación de linfocitos T y en la actividad de las células NK, sino también una supresión parcial en la síntesis de citoquinas y de la citotoxicidad de células T dependiente de β -endorfina. (Blalock, 1994; Vinitzky y Taibo, 1997) La respuesta linfocitaria proliferativa es suprimida por GC, reflejada en una síntesis de citoquinas disminuidas, una respuesta a mitógenos retardada o ausente, un reconocimiento de antígeno y actividad citotóxica marcadamente alterada, observando adicionalmente en ratas, conejos y ratones, una linfocitólisis inducida por GC (Papich y Davis, 1989). Sin embargo, en esta investigación se evidenció una disminución significativa inducida por cortisol, sólo en los linfocitos CD8, situación parcialmente discordante con los estudios que señalan una mayor disminución en los linfocitos CD4 circulantes en sangre, en relación a los CD8 luego de la exposición a glucocorticoides. No obstante, en la presente investigación no se realizó recuento selectivo de CD4 – CD8 en sangre, analizándose en cambio, la población tisular linfoide de estas células.

Adicionalmente, como se conoce la capacidad del plomo para aumentar los niveles de catecolaminas plasmáticas, reflejando la hiperactividad del sistema nervioso simpático (Vysocil y col., 1991), es posible que la estimulación selectiva de los altos niveles de catecolaminas sobre los receptores β -adrenérgicos linfocitarios, provoquen una inhibición (mediada por este receptor) en la proliferación y funcionamiento de los linfocitos T (Vinitzky y Taibo, 1997). Complementariamente, se sabe que los glucocorticoides *per se* facilitan o potencian los receptores adrenérgicos, situación reflejada en la hipertensión observada en los humanos y animales con enfermedad de Cushing (hiperadrenocorticismos).

Paralelamente, la disminución inducida por plomo, en el número de linfocitos T encontrada en el presente estudio, puede deberse a la alteración por plomo en los niveles de neuropéptidos hipofisarios, aislándose hace algunos años, receptores en timocitos y células epiteliales tímicas para GH, PRL, ACTH, T3, β -endorfinas y otras hormonas peptídicas (Dardenne y Savino, 1994). En contraste a los efectos estimulatorios sobre la regulación de otras hormonas pituitarias, el hipotálamo primariamente inhibe la liberación de prolactina a través de la secreción de dopamina (Nichols y Thompson, 1995). Concluyentemente, la mayor actividad dopaminérgica

inducida por plomo (Cory-Slechta y Widzowsky, 1991; Luthman y col., 1994), disminuirá los niveles de prolactina secretada por la hipófisis, describiéndose para prolactina *in vitro* e *in vivo*, una estimulación en la síntesis de DNA, proliferación de linfocitos T y estimulación en la actividad de células NK (Vinitzky y Taibo, 1997). La disminuida liberación de GH hipofisiaria, puede jugar un rol de importancia en la explicación del crecimiento retardado observada en sujetos expuestos a plomo, demostrándose la capacidad del plomo para suprimir la hormona liberadora de GH (GRF), disminuyendo además la captación celular hipofisiaria de GRF en ratas lactantes (Luthman y col., 1994; Ronis y col., 1996). El papel funcional de la GH en timo (timotrófica) ha sido descrita y demostrada en animales con enanismo por deficiencia de GH. En estos animales existe además, un descenso en los niveles de timulina (tiene como elemento prostético al zinc), hormona tímica estimulante de la proliferación y diferenciación de linfocitos, observándose una hipoplasia del timo con un número disminuido de linfocitos CD4 y CD8 (Dardenne y Savino, 1994; Tizard, 1998). Se ha observado tradicionalmente en todos nuestros experimentos donde se ha usado plomo como exposición subaguda en ratas prepúberes, un bajo peso al destete de las crías; siendo un parámetro oficialmente no evaluado en este, ni en los otros ensayos realizados en nuestro laboratorio.

Otra interesante teoría postulada por el autor y otros investigadores, sugiere una alteración del plomo en la respuesta inmune mediada por células y en la interacción secundaria con segundos mensajeros que median la actividad y proliferación linfocitaria, explicando de esta forma la depleción en los linfocitos CD4 y CD8 observada en la presente investigación. Nuestros resultados coinciden con los reportes que indican una disminución por plomo en la proliferación de linfocitos inducidas por mitógenos, siendo los linfocitos T humanos más resistentes que los linfocitos de roedores (Lang y col., 1993), aunque otras experimentos adicionalmente muestran que el plomo estimula la síntesis de inmunoglobulinas por linfocitos B, en presencia de linfocitos Th (*helper*), modificando la reactividad del sistema inmune debido a la alteración en la diferenciación de células Th *naives*, inhibiendo las Th1 y su producción de γ -IFN e IL2, activando las Th2 y la síntesis de IL4 (McCabe y Lawrence, 1991; Yeo y col., 1998). Aunque en nuestra investigación no se evaluó

ningún efecto diferencial sobre la subpoblación de linfocitos CD4 (Th1 – Th2), el mecanismo de acción postulado puede servir para explicar como el plomo altera la fisiología celular linfocitaria. Sin embargo, otras investigaciones han demostrado en trabajadores con exposición ocupacional a plomo, un aumento o al menos un recuento sanguíneo invariable de CD8, con una disminución en el porcentaje absoluto de CD3-CD4 circulantes (Fischbein y col., 1993; Sata y col., 1998).

La disminución del número de linfocitos tímicos encontrada en este estudio puede explicarse por la estimulación por plomo en la actividad de la adenilato ciclasa (AC), aumentando los niveles de AMPc y disminuyendo consecuentemente la función, proliferación y síntesis de proteínas de los linfocitos T (Muller y col., 1990; Yeo y col., 1998). No obstante, algunos estudios realizados en otros tejidos, como en el músculo esquelético, han demostrado que el plomo disminuye la concentración de AMPc por una sobreactivación de la fosfodiesterasa activada por calmodulina (PDE-CAM); en tanto, en la corteza cerebral, el plomo interactúa negativamente con la proteína G y con la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa (AC), disminuyendo con ello la formación de AMPc a partir de ATP.

Complementariamente, la inhibición por concentraciones micromolares de plomo en la fosforilación mediada por las proteínquinasas (Tonner y Heiman, 1991; Goldstein, 1993; Sun y col., 1999), puede disminuir la estimulación en la función y proliferación de linfocitos T dependiente de la actividad del receptor para diversas citoquinas asociadas a la tirosinquinasa (Tyk) citoplasmáticas solubles (la mayoría de los receptores para citoquinas no posee actividad Tyk intrínseca de membrana), tales como la JAK-2 (Janus-2) y la SH2 (homóloga a la Src), las que activan finalmente las STATs (transductoras de señales y activadoras de la transcripción), o las MAPK (proteína quinasa asociada a mitógenos) y los factores transcripcionales para los protooncogenes como *c-myc*, *c-fos* o *c-jun* (Simpson y col., 1997). Adicionalmente, en el proceso de reconocimiento antigénico (expresado por la células somáticas o macrófagos) y posterior activación del linfocito T CD8 o CD4, intervienen proteínas de membrana diversas como el TCR (receptor de células T), el HLA I y II (antígeno de histocompatibilidad) y otros ligandos de adhesión (CD54-CD11/CD18,

CD58-CD2), todos los cuales (TCR-HLA) también activan proteínas tirosinaquinasas de la familia homóloga a *src* (SH-2), *syk* y de la ZAP-70 (proteína-70 asociada a la cadena CD3- ζ), las que terminalmente activan una fosfolipasa (PLC γ 1), fosfoinositol-3 (PI₃), calcineurina, PKC, *ras* y algunos otros factores transcripcionales específicos, determinando finalmente la síntesis de interleukinas, interferones y diversas citoquinas estimulantes de la respuesta inmune (Haynes y Fauci, 2001). En oposición, otras investigaciones sugieren que tanto las concentraciones picomolares, como las nanomolares, activan las PKC dependientes e independientes de calmodulina, como también la PDE-CAM. Las observaciones anteriormente descritas, suponen entonces que las concentraciones tisulares (celulares) de plomo deberían estar en el rango micromolar de acuerdo a los valores sanguíneos obtenidos (aunque no reportados), los que fluctuaron alrededor de 40 $\mu\text{g/dL}$. Se requieren mayores análisis para evaluar el efecto del plomo sobre la función y regulación de los segundos mensajeros, teniéndose en cuenta que el efecto del plomo depende de la concentración tisular, del momento del desarrollo en el cual el individuo se ve expuesto y del órgano específico donde se evalúa el efecto.

La depleción asociada a plomo en la población de células T, puede obedecer a la habilidad del plomo para inducir la lipoperoxidación de membranas celulares, con la consiguiente citólisis linfocitaria, hecho reforzado por diversos estudios que señalan al plomo catalizando la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, demostrando ser citotóxico debido a la alteración en los procesos relacionados con la integridad de la membrana celular (Yiin y Lin, 1995; Adonaylo y Oteiza, 1999). Se encontró en trabajadores expuestos a plomo ($57.1 \pm 17.6 \mu\text{g/dL}$ de sangre), eritrocitos con una concentración disminuida de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, explicando con ello el incremento en la lipoperoxidación de membrana y la mayor sensibilidad a hemólisis (Sugawara y col., 1991). De hecho, se ha reportado una concentración aumentada de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS), con una disminución mediada por ROS en la concentración de óxido nítrico (NO) y de sus metabolitos (NOx) en orina, en modelos de hipertensión inducida por plomo en ratas de laboratorio (Vaziri y col., 1999), potenciando la formación de ROS dependiente de hierro, en preparaciones de sinaptosomas cerebrales (Bondy y Guo, 1996).

Consecuentemente, la potenciación del *stress* oxidativo inducido por la exposición a plomo en las ratas de la presente investigación, podría explicar la reducción en el número de linfocitos CD4 y CD8 en timo, provocando apoptosis de linfocitos tímicos. El aumento en los niveles intracelulares de ROS provenientes de las fuentes naturales como la oxidación mitocondrial, el sistema asociado al retículo endoplásmico (citocromo P450), los NAD(P)H, los peroxisomas, diversas proteínas y enzimas (xantino-oxidasa), provocan finalmente depleción celular de NAD/NADH y colapso en las reservas de ATP con la consiguiente muerte celular (Buttke y Sandstrom, 1994; Morello y col., 1998). Relacionado con lo anterior, el plomo también ha demostrado directamente destruir *in vitro*, la membrana celular en monocitos, linfocitos B y linfocitos T (Steffensen y col., 1994), disminuyendo además, el contenido de DNA *in vivo*, al igual que la incorporación de timidina tritiada *in vitro*, en células de timo en animales experimentales (Ficek, 1994).

La ausencia de fluorescencia encontrada en los cortes de bazo para las cuatro condiciones experimentales, puede obedecer al no reconocimiento del antígeno específico presente en los linfocitos T por los anticuerpos comerciales usados, fenómeno que debe ser dilucidado en futuros ensayos.

C. Eosinofilia tisular y degranulación:

La disminución de la eosinofilia observada en timo, bajo microscopía de fluorescencia (MF), acompañada de una degranulación incrementada evidenciada en bazo, en los grupos expuestos a plomo en su vida prepuberal, sugiere en cierto grado, una alteración asociada a plomo de algunos eventos relacionados con la actividad funcional del leucocito eosinófilo (EOS), como la maduración, adhesión, migración tisular, activación y posterior degranulación (DEG), influenciando finalmente la modulación del leucocito eosinófilo sobre la inflamación y la respuesta inmune (Sabag y col., 1978; Corrigan y Kay, 1992; Spry y col., 1992).

El número reducido de EOS evidenciado en timo, pero no en bazo, resultado de la comparación entre los grupos experimentales que recibieron o no plomo, denota

una sensibilidad especial de este órgano linfoide, concordando con la disminución inducida por plomo en los linfocitos tímicos en la presente investigación; alterando el plomo presumiblemente la proliferación o la quimiotaxis de EOS, dada la mayor cantidad de linfocitos T en este órgano y una compleja modulación por factores de regulación y crecimiento intratímicos linfocitarios y eosinopoyéticos, debido a su calidad de órgano linfoide primario (Rittor y Boyd, 1993; Dardenne y Savino, 1994).

La mayor DEG de EOS asociada a plomo (eosinófilos con menor área y volumen) observada en bazo, pero no en timo, sugiere una mayor influencia selectiva del bazo, en relación a los estímulos desencadenantes del proceso degranulatorio, dado su función inmunológica relacionada con el reconocimiento y procesamiento de antígenos por sus abundantes macrófagos, la filtración y posterior fagocitosis de partículas, diversos hemoparásitos y eritrocitos alterados, siendo de preponderancia la participación en la respuesta inmune humoral a través de la producción de inmunoglobulinas (Couto , 1989).

La menor población de EOS tímicos detectables bajo la técnica usada en el presente trabajo (microscopia de fluorescencia), concuerda con nuestros otros resultados obtenidos, los que implican al plomo disminuyendo la población de linfocitos en los órganos linfoides, suprimiendo posiblemente la función y la proliferación linfocitaria, la que a su vez determinará una disminución en la síntesis de citoquinas que estimulan la maduración de los EOS tales como GM-CSF, IL3 e IL5 (Kowolenko y col., 1991; Corrigan y Kay, 1992; Spry y col., 1992; Fischbein y col., 1993). Otras investigaciones indican que la adhesión y migración de EOS a tejidos linfoides puede ser alterada por plomo indirectamente al suprimir la síntesis de IL1 linfocitaria, la que induce en forma fisiológica la expresión de moléculas de adhesión eosinofílicas, como las integrinas, mec-1 y VLA-4, las cuales son requeridas para la adhesión y posterior migración hacia los tejidos linfoides (Spry y col., 1992). La adición de plomo a cultivos celulares de polimorfonucleares o macrófagos pulmonares, modifica la actividad quimiotáctica, la producción de LTB4 y los niveles de TNF- α (Valentino y col., 1991; Cohen y col., 1994), siendo asociada a ambas citoquinas, una actividad eosinotáctica leve, estimulando además la DEG (LTB4)

(Gleich, 1988; Corrigan y Kay, 1992). Adicionalmente, se ha reportado una desviación asociada a plomo, en la respuesta linfocitaria hacia las células Th2, aumentando la síntesis de IgG, IgE e IL5 (Corrigan y Kay, 1992; Borella y Bargellini, 1993; Heo y col., 1996; Lutz y col., 1999), implicadas en la estimulación de algunas respuestas de los EOS, como la maduración y la degranulación selectiva mediada por el sistema inmune. Todos estos reportes sustentan indirectamente nuestros hallazgos, pareciendo razonable encontrar una incrementada cantidad de EOS hipodensos (bazo) y una disminuida eosinofilia tisular (timo). La mayor cantidad de EOS hipodensos observados en bazo, transformándose en células con escasa visualización bajo el microscopio para fluorescencia, es en apariencia coincidente con los reportes sugerentes de la actividad potenciadora del plomo sobre el grado de DEG de EOS en sangre (Villagra y col., 1997); no descartándose para este caso, una DEG localizada en el microambiente esplénico.

La disminución en el número de EOS tímicos inducidos por plomo, como se apreció al comparar los grupos que recibieron o no plomo durante su vida prepuberal, podría explicarse desde una perspectiva específica, a través de la disminución en el número de R para GC, lo que a su vez influirá negativamente en la interacción propuesta entre los R para GC existentes tanto en EOS, como en los endotelocitos de los vasos sanguíneos linfoides (Tchernitchin y col., 1982; Tchernitchin y col., 1985), suprimiendo en alguna medida la adhesión de los EOS al endotelio capilar y la posterior migración de los EOS adheridos hacia timo. Sin embargo, la similitud estadística obtenida en el presente estudio entre los grupos expuestos o no a plomo, en lo referente al número de receptores esteroidales para GC, invalida esta inferencia para el caso de la presente investigación.

En general, en la transducción de señales extracelulares vía receptores para interleukinas, inmunoglobulinas o diversos factores que gatillan la DEG de los EOS, participan la proteína G asociada a la fosfolipasa C (PLC), con la consecuente producción de diacilglicerol (DAG) y fosfoinosítoles de membrana (IP₂₋₃), aumentando finalmente los niveles de calcio citosólicos, favoreciendo de esta forma la fusión de membranas de los gránulos y la exocitosis terminal de su contenido hacia el medio

extracelular. En adición, para los receptores de membrana para estas citoquinas e inmunoglobulinas, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de estimulación de colonias granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF), diversas interleukinas (IL3 e IL5) y leucotrienos (LTB4-D4), el factor de activación plaquetario (PAF), las quemoquinas (RANTES) e inmunoglobulinas (A, G, E), se asocia una segunda vía de transducción representada por las proteínas tirosinaquinasas de las familias *SH-2*, *syk* y *JAK-2*, las que a su vez fosforilan y activan factores transcripcionales terminales como *ras/raf-1*, MEK, ERK y STAT, determinando finalmente una mayor síntesis de proteínas funcionales que median no sólo la actividad degranulatoria en alguna medida, sino también (principalmente) la maduración, quimiotaxis y proliferación dependiente de los estímulos del medio extracelular (Giembycz y Lindsay, 1999). Por lo tanto, es posible que el proceso de exocitosis de los gránulos de los EOS encontrados en bazo, se vea potenciado por plomo a través del aumento en los niveles de calcio intracelular, tal como ocurre en las plaquetas expuestas a plomo (Wiemann y col., 1999), modificando la conformación de fosfoinosítóles de membrana y favoreciendo consecuentemente la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico hacia el citosol (Dowd y Gupta, 1991). Este último mecanismo debería ser más preponderante fisiológicamente en la DEG de los EOS, en comparación con el descrito para las tirosinaquinasas, debido a que la inhibición por plomo (concentraciones micromolares) de la fosforilación mediada por las proteínaquinasas (Tonner y Heiman, 1991; Goldstein, 1993; Sun y col., 1999), podría explicar más bien una disminución en la DEG de los EOS esplénicos, que un aumento de ella. No obstante, esta reducción en la tasa de fosforilación intracelular puede explicar fácilmente la menor eosinofilia tisular observada en timo, sumado a la disminución por plomo encontrada en el presente trabajo en la población de linfocitos tímicos, fenómeno que altera presumiblemente la proliferación y quimiotaxis de los EOS, situación descrita anteriormente.

Como se ha descrito con anterioridad, el plomo en concentraciones micromolares aparentemente disminuye la tasa de fosforilación, inhibiendo la actividad de los distintos tipos de proteínas quinasas presentes en diversos tejidos, no siendo la excepción el caso de los EOS probablemente. En efecto, recientemente se

ha demostrado que la fosforilación de proteínas (tirosina) regula la inhibición y aceleración de la apoptosis de neutrófilos y EOS, determinando el tiempo de supervivencia final de estas células. Es así, como la fosforilación de tirosina expresada como un aumento en la actividad de proteínas citoplasmáticas solubles con actividad tirosinaquinasa (Tyk) como *JAK-2* y el factor asociado STAT, ejercen sus efectos intranucleares que determinan una normal inhibición de la apoptosis, prolongando la supervivencia del EOS. En contraste a otros tipos celulares, la apoptosis granulocítica no parece requerir la expresión de nuevos genes, más bien, las citoquinas que inhiben la apoptosis de EOS en forma fisiológica, inducen genes denominados “*anti-killer*” (Spry y col., 1992; Simon y Blaser, 1995). Debido a que el plomo puede provocar una disminución en la fosforilación de tirosina (receptor tirosina-quinasa), es posible que afecte el tiempo de supervivencia del eosinófilo al alterar los mecanismos que regulan su apoptosis, pudiendo alterar también la regulación de la expresión de genes antiapoptóticos, determinando finalmente una disminución de la eosinofilia principalmente en timo.

Como explicación adicional, la presencia de una mayor DEG de EOS en bazo puede ser mediada por una incrementada estimulación de receptores β -adrenérgicos presentes en su superficie, fenómeno consecuencia de una mayor cantidad de catecolaminas circulantes inducidas por plomo, hecho similar al reportado sobre los receptores linfocitarios (Spry y col., 1992; Nichols y Thompson , 1995; Chang y col., 1997a). Se conoce que la DEG de los EOS es mayor con la estimulación de los receptores β -adrenérgicos, los que aumentan los niveles de AMPc (vía proteína G – adenilato ciclasa), estimulando con ello la DEG. Si bien, esta premisa es verdadera en los casos de estimulación aguda-subaguda, la taquifilaxis (desensibilización de los receptores) asociada a la exposición crónica a los agentes adrenérgicos, puede deprimir progresivamente la tasa de degranulación.

Sorprendentemente, los grupos de animales a los cuales se inyectó HC, no manifestaron ninguno de los efectos esperados, demostrándose para timo ningún efecto especial, situación que para el caso de bazo, sugiere una disminución en el número de EOS, contrariamente a los reportes que señalan una migración selectiva

de EOS hacia timo, bazo y ganglios linfáticos inducida por GC (Sabag y col., 1978; Tchernitchin y col., 1984). Sin embargo, los estudios realizados con anterioridad al presente reporte se hicieron con un diseño similar, pero usando ratas adultas y microscopía óptica (no de fluorescencia) para el recuento directo de EOS. En efecto, los EOS esplénicos provenientes de ratas impúberes teñidos con anilina/eosina y mirados bajo MF, parecen ser disminuídos en número al ser expuestos a GC, hecho sin precedentes en la investigación del efecto de los EOS en los tejidos linfoides; revelando posiblemente variaciones presentes en los animales prepúberes de los mecanismos involucrados en la migración de EOS hacia los órganos linfoides (por ej. madurez de los R para GC) o factores ambientales desconocidos presentes en el momento de la investigación. La HC, interesantemente, parece revertir los efectos negativos del plomo sobre el volumen y área ocupados por los gránulos de EOS esplénicos, especialmente los gránulos con menor luminosidad fluorescente, pudiendo corresponder a un tipo granular específico o a gránulos con una distinta proporción de proteínas contenidas en su interior, afectadas todas ellas selectivamente por plomo.

Estudios realizados en el Laboratorio de Endocrinología Experimental y Patología Ambiental (LEEPA) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, aunque no publicados, sugieren un efecto degranulatorio selectivo sobre el tipo de gránulos y/o de proteínas específicas dentro de estos, no sólo del plomo, sino también de diversas sustancias químicas y hormonas esteroidales, existiendo además, variación en la fluorescencia emitida por los gránulos al ser excitados con diferentes longitudes de onda.

Si bien, no existen estudios que revelen los efectos del plomo sobre la actividad y estructura de los gránulos de los EOS, es posible aventurar desde ya, una alteración potencial en la composición de la proteína mayor básica (MBP) dentro de los gránulos secundarios. La MBP es rica en arginina, incluyendo residuos de triptofano, cisteína y grupos sulfidrilos reactivos (Gleich, 1988), pudiendo estos residuos ser alterados por la conocida afinidad del plomo por los grupos sulfidrilos (Dabrouwska- Bouta, 1996; Hanas y col., 1999), afectándose de esta forma no sólo la

actividad de enzimas y proteínas intervinientes en los distintos procesos metabólicos del EOS, sino también la tasa de DEG de sus gránulos secundarios.

Como información adicional se demostró estadísticamente, aunque la percepción visual así lo indicaba, un mayor volumen de EOS esplénicos; siendo los EOS de timo más pequeños pero con mayor contenido de gránulos más luminosos (brillantes), denotando probablemente con ello una composición bioquímica diferencial de sus gránulos; sospechándose un comportamiento funcional “no idéntico” entre los dos grupos de EOS, en relación a su quimiotáxis, maduración y degranulación local inducida por selectas citoquinas, inmunoglobulinas, químicos y hormonas.

Aunque al ser comparados estadísticamente los grupos experimentales en forma individual, no se comprobó una alteración del plomo y/o la HC sobre la DEG de EOS en timo (observados bajo MF), es probable que esto sea consecuencia de la potenciación selectiva sólo en la DEG de los gránulos de menor luminosidad, tal como la obtenida en los bazos de animales expuestos a plomo, no descartándose la ocurrencia de este fenómeno en timo, aunque apreciada escasamente debido a la posible escasa cantidad de gránulos de menor luminosidad encontrados o al enmascaramiento provocado por los gránulos más brillantes, los que según nuestra experiencia parecen ser más abundantes en timo.

La supresión asociada a HC, en la DEG de EOS esplénicos inducida por plomo, puede reflejar interacciones que no son explicadas por las respuestas provocadas por plomo y por HC en forma individual. La HC puede inducir en los EOS esplénicos una disminución en las concentraciones de calcio intracelular, mediado por PKC asociado a la proteína G; situación similar a la reportada para corticosterona, la cual inhibe el influjo de calcio dependiente del receptor nicotínico en células cultivadas de feocromocitoma, fenómeno antagonizado por inhibidores de la PKC y bloqueado por la toxina de Bordetella pertussis (inhibidor de la proteína G); produciéndose esta respuesta sólo con la exposición aguda (<48 hrs) a glucocorticoides (Falkenstein y col., 2000), explicando de esta forma la atenuación en

la DEG asociada a los GC, observada en nuestra investigación en el grupo expuesto previamente a plomo. También es posible que la estabilización de membranas del EOS por HC, fenómeno observado en granulocitos de mamíferos sometidos a dosis suprafarmacológicas de GC (Papich y Davis, 1989), pueda demostrar en la rata, en especial la rata prepúber con previa exposición a plomo, una alta susceptibilidad a los efectos de los GC sobre las membranas biológicas, sugiriendo alguna alteración en la regulación de los procesos inmunoendocrinos involucrados en la respuesta adaptativa frente al *stress*.

VII. CONCLUSIONES:

A. Radioautografía:

- No se detectaron diferencias significativas en el número de receptores para glucocorticoides, en bazo y timo de ratas expuestas o no a plomo durante su vida prepuberal, de acuerdo al número de muestra obtenida.
- Debido a la existencia de una tendencia (aunque estadísticamente no significativa) a la disminución en el número de receptores para glucocorticoides en los animales expuestos a plomo, sería interesante realizar futuros ensayos destinados a demostrar alguna diferencia producto de la exposición prepuberal y prenatal a plomo.

B. Inmunofluorescencia (población de linfocitos T *helper* y citotóxicos):

- La exposición a plomo en las ratas prepuberales, disminuye el número de linfocitos T presentes en timo, explicando (al menos en parte) la alteración en la función inmunológica observada en sujetos expuestos a este metal.
- En los animales tratados con plomo se observa una depleción, tanto en la población de linfocitos citotóxicos (CD8), como en el número de linfocitos T *helper* (CD4); representando probablemente algunos de los mecanismos por los cuales el plomo induce hipersensibilidad, autoinmunidad o inmunosupresión.

C. Eosinofilia tisular y degranulación:

- Ratas prepúberes expuestas a plomo en forma subaguda, presentan una alteración en los eventos relacionados con la función del leucocito eosinófilo, afectando su modulación sobre la respuesta inmune.
- El tratamiento subagudo con plomo en ratas impúberes, provoca una disminución de la eosinofilia tisular en timo.
- Plomo induce *in vivo* una respuesta degranuladora de los eosinófilos esplénicos.
- El tratamiento con glucocorticoides luego de la exposición a plomo, parece revertir la degranulación de los eosinófilos esplénicos inducida por plomo.
- La aplicación de glucocorticoides en ratas prepúberes, determina un menor número de eosinófilos en bazo detectados bajo microscopia de epifluorescencia.
- Los eosinófilos esplénicos son de mayor tamaño que los eosinófilos de timo.
- Los eosinófilos tímicos presentan una mayor cantidad de gránulos intensamente fluorescentes en comparación a los eosinófilos de bazo.

VIII. BIBLIOGRAFÍA:

-ADARMES, H.; GONZÁLEZ, E. 1992. Mecanismos moleculares que regulan el calcio intracelular y su asociación con la respuesta orgánica. Monografías Med. Vet. 14 (2): 39-46.

-ADONAYLO, V.N.; OTEIZA, P.I. 1999. Pb²⁺ promotes lipid oxidation and alterations in membrane physical properties. Toxicology. 132: 19-32.

-BAUMAN, J.W.; LIU, J.; KLAASSEN, C.D. 1993. Production of metallothionein and heat-shock proteins in response to metals. Fundam. Appl. Toxicol. 21: 15-22.

-BLALOCK, J.E. 1994. The syntax of immune-neuroendocrine communication. Immunol. Today 15: 504-511.

-BONDY, S.C.; GUO, S.X. 1996. Lead potentiates iron-induced formation of reactive oxygen species. Toxicol. Lett. 87: 109-112.

-BOOTH, N.H. 1987. Residuos medicamentosos y químicos de los tejidos comestibles animales. En Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Booth, N.H. y McDonald, L.E. (Eds.). 5^{ta} Ed. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. p: 497.

-BORELLA, P.; BARGELLINI, A. 1993. Effects of trace elements on immune system: results in cultured human lymphocytes. J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis. 7: 213-231.

-BOSCOLO, P.; GIOACCHINO, M.; SABBIONI, E.; BENVENUTI, F.; CONTI, P.; REALE, M.; BAVAZZANO, P.; GIULIANO, G. 1999. Expression of lymphocyte subpopulations, cytokine serum levels, and blood and urinary trace elements in asymptomatic atopic men exposed to an urban environment. Int. Arch. Occup. Environ. Health 72: 26-32.

-BOUMPAS, D.T. 1993. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. Annals of Internal Medicine 119: 1198-1208.

-BRAGA, M.F.; PEREIRA, E.F.; ALBUQUERQUE, E.X. 1999. Nanomolar concentrations of lead inhibit glutamatergic and GABAergic transmission in hippocampal neurons. Brain Res. 826: 22-34.

-BRATTON, G.R.; HINEY, J.K.; DEES, W.L. 1994. Lead (Pb) alter the norepinefrine-induced secretion of luteinizing hormone releasing hormone from the median eminence of adult male rats *in vitro*. Life Sci. 55: 563-571.

-BUTTKE, T.M.; SANDSTROM, P.A. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunol. Today 15: 7-10.

- CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A.; LEONARD, D.A.; ZHAO, X.Q. 1995. Decrease in hepatotoxicidad by lead exposure is not explained by its mitogenic response. *J. Appl. Toxicol.* 15: 129-132.
- CARSIA, R.V.; FORMAN, D.; HOCK, C.E.; NAGELE, R.G.; McLLROY, P.J. 1995. Lead alters growth and reduces angiotensin II receptor density of rat aortic smooth muscles cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 210: 180-190.
- CARSON-JURICA, M.A.; SCHRADER, W.T.; O'MALLEY, B.W. 1990. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr. Rev.* 11: 201-219.
- CASTANO, R.; CULEBRAS, C.; ZAZUETA, C.; CHAVEZ, E. 1991. Protective role of chlorpromazine on lead-induced damage to heart mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 99: 379-381.
- CASTILLO-MENDEZ, A.; RODRÍGUEZ-DIAZ, T.; LEON-LOBECK, A.; GRAVALOSA-CRUZ, A. J. 1993. Effects of occupational lead exposure on the immunoglobulin concentration and cellular immune function in man. *Rev. Alerg.* 40: 95-97.
- CASTRILLÓN, M.A.; GRUNERT, G.; LÓPEZ, M.; TCHERNITCHIN, A.N. 1982. Effects of progesterone on spleen eosinophilia. *IRCS. Med. Sci.* 10: 955-956.
- CENTER, S.A.; RANDOLPH, J.F. 1991. Eosinophilia. In *Consultation in Feline Internal Medicine*. August, J.R. (Ed.). W.B.Saunders Co. Phil. USA. pp: 349-358.
- CHANG, H.R.; CHEN, S.S.; TSAO, D.A.; CHENG, J.T.; HO, C.K.; YU, H.S. 1997a. Change of cardiac beta-adrenoceptors in lead-exposed rats. *Toxicology* 123: 27-32.
- CHANG, H.R.; CHEN, S.S.; TSAO, D.A.; CHENG, J.T.; HO, C.K.; YU, H.S. 1997b. Reduced vascular beta-adrenergic receptors and catecholamine response in rats with lead induced hypertension. *Arch. Toxicol.* 71: 778-781.
- CHANG, H. R.; CHEN, S.S.; CEHN, T.J.; HO, C.K.; CHANG, H.C.; YU, H.S. 1996. Lymphocyte β 2-adrenergic receptor and plasma catecholamine levels in lead-exposed workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139: 1-5.
- CHEM, H.H.; MA, T.; HO, I.K. 1999. Protein kinase C in rat brain is altered by developmental lead exposure. *Neurochem. Res.* 24: 415-421.
- CHEM, H.H.; MA, T.; HUME, A.S.; HO, I.K. 1998. Developmental lead exposed alters the distribution of protein kinase C activity in the rat hippocampus. *Biomed. Environ. Sci.* 11: 61-69.
- CHOW, T.J.; BENNET, C.F. 1969. Lead aerosols in marine atmosphere. *Environ. Sci. Technol.* 3: 737-740.

- CIESSIOLKA, J.; MICHALOWSKI, D.; WRZESINSKI, J.; KRAJEWSKI, J.; KRZYZOSIAK, W.J. 1998. Patterns of cleavages induced by lead ions in defined RNA secondary structure motifs. *J Mol. Biol.* 275: 211-220.
- CLAVERO, L.A. 1999. Efecto de exposición subaguda a plomo sobre algunas variables de respuesta estrogénica en útero de rata impúber. Tesis Med. Vet. Fac. Cs. Vet. y Pec. U. de Chile. pp: 74-77.
- COHEN, M.D.; YANG, Z.; ZELIKOFF, J.T. 1994. Immunotoxicity of particulate lead: in vitro exposure alters pulmonary macrophage tumor necrosis factor production and activity. *J. Toxicol. Environ. Health* 42: 377-392.
- CONTI, M.; JIN, C.; MONACO, L.; REPASKE, D.R.; SWINNEN, J.V. 1991. Hormonal regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Endocr. Rev.* 13: 218- 234.
- COREY, G.; GALVAO, L. 1989. Plomo. Serie Vigilancia núm. 8. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OPS. OMS. México. 103 p.
- CORRIGAN, C.J.; KAY, A.B. 1992. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol. Today* 13: 501- 507.
- CORY-SLECHTA, D.A.; WIDZOWSKY, D.V. 1991. Low level lead exposure increases sensitivity to the stimulus properties of dopamine D1 and D2 agonists. *Brain Res.* 553: 65-74.
- COUTO, C.G. 1989. Diseases of the lymph nodes and the spleen. In *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Ettinger, S.J. & Feldman E.C. (Eds.). 3th Ed. W.B.Saunders Co. Phil. USA. pp: 2235-2245.
- CSABA, G. 1986. Receptor ontogeny and hormonal imprinting. *Experientia* 42: 750-759.
- CUNNINGHAM, F.M. LEES, P. 1994. Advances in anti-inflammatory therapy. *Br. Vet. J.* 150: 115-131.
- DABROUWSKA-BOUTA, B.; STRUZYNSKA, L.; RAFALOWSKA, U. 1996. Effect of acute and chronic lead exposure on the level of sulfhydryl groups in rat brain. *Acta Neurobiol. Exp.* 56: 233-236.
- DARDENNE, M.; SAVINO, W. 1994. Control of thymus physiology by peptidic hormones and neuropeptides. *Immunol. Today* 15: 518-523.
- DEGAWA M.; ARAI, H.; KUBOTA, M.; HASHIMOTO, Y. 1994. Ionic lead, a unique metal ion as an inhibitor for cytochrome P450IA2 (CYP1A2) expression in the rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200: 1086-1092.
- DOWD, T.L.; GUPTA, R.K. 1991. 19F-NMR study of the effect of lead on intracellular free calcium in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 1092: 341-346.

- DYATLOV, V.A.; PLATOSHIN, A.V.; LAWRENCE, D.A.; CARPENTER, D.O. 1998. Lead potentiates cytokine and glutamate-mediated increases in permeability of the blood-brain barrier. *Neurotoxicology* 19: 283-291.
- EVANS, M.L.; BUSSELBERG, D.; CARPENTER, D.O. 1991. Pb²⁺ blocks calcium currents of cultured dorsal root ganglion cells. *Neurosci. Lett.* 129: 103-106.
- FALKENSTEIN, E.; TILLMANN, H-C.; CHRIST, M.; FEURING, M.; WEHLING, M. 2000. Multiple actions of steroid hormones. A focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Rev.* 52. 513-555.
- FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. 1996. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 2th Ed. W.B.Saunders Co. Phil. USA. pp: 323-337.
- FELDMAN, E.C. 1983. La corteza adrenal. En *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*. Ettinger, S.J. & Feldman E.C. (Eds.). 2^{da} Ed. Editorial Intermédica. Buenos Aires. Argentina. pp: 1543-1544.
- FICEK, W. 1994. Heavy metals and the mammalian thymus: *in vivo* and *in vitro* investigations. *Toxicol. Ind. Health.* 10: 191-201.
- FISCHBEIN, A.; TSANG, P.; LUO, J.C.; ROBOZ, J.P.; JIANG, J.D.; BEKESI, J.G. 1993. Phenotypic aberrations of CD3⁺ and CD4⁺ cells and functional impairments of lymphocytes at low-level occupational exposure to lead. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 66: 163-168.
- FOX, D.A.; HE, L.; POBLENZ, A.T.; MEDRANO, C.J.; BLOCKER, Y.S.; SRIVASTAVA, D. 1998. Lead-induced alterations in retinal cGMP phosphodiesterase trigger calcium overload, mitochondrial dysfunction and rod photoreceptor apoptosis. *Toxicol. Lett.* 102-103: 359-361.
- FOX, D.A.; CAMPBELL, M.L.; BLOCKER, Y.S. 1997. Functional alterations and apoptotic cell death in the retina following developmental or adult lead exposure. *Neurotoxicology* 18: 645-664.
- FOX, D.A.; RUBINSTEIN, S.D.; HSU, P. 1991. Developmental lead exposure inhibits adult rat retinal, but not kidney, Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 109: 482-493.
- GLASS, C.K. 1994. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr. Rev.* 15: 391-407.
- GIEMBYCZ, M.A.; LINDSAY, M. A. 1999. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol. Rev.* 51: 213-340.
- GLEICH, G.J. 1988. Current understanding of eosinophil function. *Hosp. Pract.* 23: 137-160.

- GOLDSTEIN, G.W. 1993. Evidence that lead as a calcium substitute in second messenger metabolism. *Neurotoxicol.* 14:97-101.
- GOODFRIEND, T.L.; BALL, D.L.; ELLIOTT, M.E.; SHACKLETON, C. 1995. Lead increases aldosterone production by rat adrenal cells. *Hypertension* 25: 785-789.
- GRABOWSKA, M.; GUMINSKA, M. 1996. The effect of lead on lactate formation, ATP levels and membrane ATPase activities in human erythrocytes *in vitro*. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 9: 265-274.
- GRABOWSKA, M.; GUMINSKA, M.; IGNACAK, J. 1991. Inhibitory effect of environmental pollutants on erythrocyte membrane ATPase activity in humans. *Folia Med. Cracov.* 32: 103-110.
- GRUNERT, G.; PORCIA, M.; TCHERNITCHIN, A. N. 1986. Differential potency of oestradiol-17 β and diethylstilboestrol on separate groups of responses in the rat uterus. *J. Endocr.* 110: 103-114.
- GUILARTE, T.R. 1997. Glutamatergic system and developmental lead neurotoxicity. *Neurotoxicology* 18: 665-672.
- GUO, T.L.; MUDZINSKI, S.P.; LAWRENCE, D.A. 1996. The heavy metal lead modulates the expression of both TNF-alpha and TNF-alpha receptors in lipopolysaccharide-activated human peripheral blood mononuclear cells. *J. Leukoc. Biol.* 59: 932-939.
- HAYNES, B.F.; FAUCI, A.S. 2001. Introduction to the immune system. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Braunwald, E. et al. (Eds). 15th Ed. McGraw Hill. N.Y. USA. pp: 1805-1830.
- HANAS, J.S.; RODGERS, J.S.; BANTLE, J.A.; CHENG, Y.G. 1999. Lead inhibition of DNA-binding mechanism of Cys(2) His(2) zinc finger proteins. *Mol. Pharmacol.* 56: 982-988.
- HATCH, RC. 1987. Venenos que provocan estimulación o depresión nerviosa. En *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Booth, N.H. y McDonald, L.E. (Eds.). 5^{ta} Ed. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. pp: 375-383.
- HEIMAN, A.S.; TONNER, L.E. 1995. The acute effect of lead acetate on glucocorticoid regulation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells. *Toxicology* 100: 57-68.
- HEO, Y.; PARSONS, P.J.; LAWRENCE, D:A. 1996. Lead differentially modifies cytokine production *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 138: 149-157.
- HORIGUCHI, S.; KIYOTA, I.; ENDO, G.; TERAMOTO, K.; SHINAGAWA, K.; WAKITANI, F.; KONISHI, Y.; KIYOTA, A.; OTA, A.; TANAKA, H. 1992. Serum

immunoglobulin and complement C3 levels in workers exposed to lead. J. Osaka City Med. 38: 149-153.

-HSU, P.C.; LIU, M.Y.; HSU, C.C.; CHEN, L.Y.; GUO, Y.L. 1998. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. Toxicology 128: 169-179.

-HU, H. 1997. Heavy metal poisoning. In Harrison's Principles of Internal Medicine. Fauci, A. et al. (Eds). 14th Ed. McGraw Hill. N.Y. USA. p: 2565.

-JANAWAY, C.A. Jr.; TRAVERS, P. 1994. Immunobiology. The immune system in health and disease. Curr. Biol. Ltd.-Garland Publishing Inc. London-N.Y. sections: 7:21-9:32.

-JENSEN, E.V.; DE SOMBRE, E.R. 1972. Mechanism of action of the female sex hormones. Ann. Rev. Biochem. 41: 203-230.

-JIUN, Y.S.; HSIEN, L.T. 1994. Lipid peroxidation in workers exposed to lead. Arch. Environ. Health. 49: 256-259.

-KAMINSKA, T.; FILAR, J.; MADEJ, E.; SZUSTER-CIESIELSKA, A.; KANDEFER-SZERSZEN, M. 1998. Modification of bovine interferon and tumor necrosis factor production by lead *in vivo* and *in vitro*. Arch. Immunol. Ther. Exp. 46: 323-328.

-KHANNA, R.; JOHRI, G.N. 1991. Lead and immunity: Suppression of humoral immune response to Hymenolepis nana in mice. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 35: 1-7.

-KISHIKAWA, H.; LAWRENCE, D.A. 1998. Differential production of interleukin-6 in the brain and spleen of mice treated with lipopolysaccharide in the presence and absence of lead. J. Toxicol. Environ. Health 53: 357-373.

-KLAASSEN, C.D. 2001. Heavy metals and heavy-metals antagonists. In Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 2001. Hardman, J.G.; Limbird, L.E. (Eds). 10th Ed. McGraw-Hill. NY. USA. pp: 1851-1875.

-KOWOLENKO, M.; TRACY, L.; LAWRENCE, D. 1991. Early effects of lead on bone marrow cell responsiveness in mice challenged with Listeria monocytogenes. Fundam. Appl. Toxicol. 17: 75-82.

-LANG, D.S.; MEIER, K.L.; LUSTER, M.I. 1993. Comparative effects of immunotoxic chemicals on *in vitro* proliferative responses of human and rodent lymphocytes. Fundam. Appl. Toxicol. 21: 535-545.

-LAWTON, L.J.; DONALDSON, W.E. 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. Biol. Trace Elem. Res. 28: 83-97.

-LIU, J.Y.; LIN, J.K.; LIU, C.C.; CHEN, W.K.; LIU, C.P.; WANG, C.J.; YEN, C.C.; HSIEH, Y.S. 1997. Augmentation of protein kinase C activity and liver cell proliferation in lead nitrate-treated rats. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43: 355-364.

-LONG, G.J.; ROSEN, J.F. 1994a. Lead perturbs 1,25 dihydroxyvitamin D3 modulation of intracellular calcium metabolism in clonal rat osteoblastic (ROS 17/2.8) cells. *Life Sci.* 54: 1395-1402.

-LONG, G.J.; ROSEN, J.F.; SCHANNE, F.A. 1994b. Lead activation of protein kinase C from rat brain. Determination of free calcium, lead and zinc by ¹⁹F-NMR. *J. Biol. Chem.* 269: 834-837.

-LUTHMAN, J.; LINDQVIST, E.; GERHARDT, G.A.; OLSON, L.; HOFFER, B.H. 1994. Alterations in central monoamine systems after postnatal lead acetate treatment in rats. *Environ. Res.* 65: 100-118.

-LUTZ, P.M.; WILSON, T.J.; IRELAND, J.; JONES, A.L.; GORMAN, J.S.; GALE, N.L.; JOHNSON, J.C.; HEWETT, J.E. 1999. Elevated immunoglobulin E (IgE) levels in children with exposure to environmental lead. *Toxicology.* 134: 63-78.

-MA, T.; CHEN, H.H.; LIM, D.K.; HUME, A.S.; HO, I.K. 1998. Excitatory amino acids and lead-induced neurotoxicity. *J. Toxicol. Sci.* 23 (2): 181-183.

-McCABE, M.J. Jr.; LAWRENCE, D.A. 1991. Lead, a major environmental pollutant, is immunomodulatory by its differential effects on CD4+ T cells subsets. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111: 13-23.

-McGIVERN, R.F.; SOKOL, R.Z.; BERMAN, N.G. 1991. Prenatal lead exposure in the rat during the third week of gestation: long-term behavioral, physiological, and anatomical effects associated with reproduction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110: 206-215.

-MORELLO, A.; ALDUNATE, J.; LETELIER, M.; REPETO, Y. 1998. Bases bioquímicas de la acción de drogas antichagásicas. *Arch. Biol. Med. Exp.* 21: 93-99.

-MULLER, G.H.; KIRK, R.W.; SCOTT, D.W. 1990. *Dermatología en Pequeños Animales*. 4^{ta} Ed. Editorial Intermédica. Buenos Aires. Argentina. pp: 469-474.

-MULNIX, J.A. 1987. Alteraciones endocrinas. En *Manual de Terapéutica de los Pequeños Animales*. Davis, L.A.(Ed.). Salvat Editores S.A. Mallorca. España. p: 596.

-NAGATA, K.; HUANG, C.S.; SONG, J.H.; NARAHASHI, T. 1997. Lead modulations of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor in PC12 cells. *Brain Res.* 754: 21-27.

-NARAHASHI, T.; TREISTMAN, S.N.; SUSZKIW, J.B.; MILETIC, V.; ATCHISON, W.D. 1998. Symposium overview: chemical modulation of neuroreceptors and channels via intracellular components. *Toxicol. Sci.* 45: 9-25.

- NEEDLEMAN, H.L. 1990. Low level lead exposure: a continuing problem. *Pediatrics Annals* 19: 208-214.
- NICHOLS, R.; THOMPSON, L. 1995. Pituitary-hypothalamic disease. In *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Ettinger, S.J. & Feldman E.C. (Eds.). 4th Ed. W.B.Saunders Co. Phil. USA. p: 1423.
- NILSSON, B.O.; EINARSSON, B.; MAGNUSSON, C. 1991. Lead given systematically to mice in experimental delay of implantation increases the oxygen consumption of delayed blastocysts. *Toxicol. Lett.* 56: 349-353.
- OPANASHUK, L.A.; FINKELSTEIN, J.N. 1995. Relationship of lead-induced proteins to stress response proteins in astroglial cells. *J. Neurosci. Res.* 42: 623-632.
- OPS; OMS. 1979. *Criterios de Salud Ambiental* 3: Plomo. México D.F. 169 p.
- ORTÍ, E.; BODWELL, J.E.; MUNCK, A. 1992. Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr. Rev.* 13: 105-127.
- ORUPABO, Y.; HAY, A.; EVANS, S.W. 1992. Effects of metals on interleukin-6 (IL-6) mitogenic stimulation of murine hybridoma cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 14: 723-736.
- OTTAWAY, C.A.; HUSBAND, A.J. 1994. The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Inmunol. Today* 15: 511-517.
- PAGE, C.P.; CURTIS, M.J.; SUTTER, M.C.; WALKER, M.J. 1998. Fármacos y aparato respiratorio. En *Farmacología Aplicada*. Page, C.P. et. al. (Eds). Ediciones Harcourt España S.A. Madrid. España. pp: 231-251.
- PAPICH, M.G.; DAVIS, L.A. 1989. Glucocorticoid therapy. In *Current Veterinary Therapy X*. Kirk, R.W. (Ed.). W.B.Saunders. Philadelphia. USA. pp: 54-62.
- PEARCE, E.J.; REINER, S.L. 1995. Induction of Th2 responses in infectious diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 497-504.
- PIOMELLI, S. 1996. Lead poisoning. In *Nelson's Textbook of Pediatrics*. Behrman, R.E; Kliegman, R.M.; Jenson, H.B. (Eds.). W.B.Saunders. Philadelphia. USA. pp: 2010-2013.
- POPPENGA, R.H. 1994. Intoxicaciones frecuentes en aves acuáticas, somormujos y aves de presa. En *Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales XI*. Kirk, R. y Bonagura, J. (Eds.). Interamericana-McGraw-Hill. Madrid. España. p: 207.
- QUEIROZ, M.L.; COSTA, F.F.; BINCOLETTO, C.; PERLINGEIRO, R.C.; DANTAS, D.C.; CARDOSO, M.P.; ALMEIDA, M. 1994. Engulfment and killing capabilities of neutrophils and phagocytic splenic function in persons occupationally exposed to lead. *Int. J. Immunopharmacol.* 16: 239-244.

- QUIEROZ, M.L.; ALMEIDA, M.; GALLAO, M.I.; HOEHR, N.F. 1993. Defective neutrophil function in workers occupationally exposed to lead. *Pharmacol. Toxicol.* 72: 73-77.
- RAMIN, S.M.; PORTER, J.C. 1997. A study of the cellular mechanism by which lead affects catecholamine secretion. *Life Sci.* 61: 1313-1321.
- RAZANI-BOROUJERDI, S.; EDWARDS, B.; SOPORI, M.L. 1999. Lead stimulates lymphocyte proliferation through enhanced T cell-B cell interaction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288: 714-719.
- REDIG, P.T.; LAWLER, E.M.; SCHWARTZ, S.; DUNNETTE, J.L.; STEPHENSON, B.; DUKE, G.E. 1991. Effects of chronic exposure to sublethal concentrations of lead acetate on heme synthesis and immune function in red-tailed hawks. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 72-77
- RITTOR, M.A.; BOYD, R.L. 1993. Development in the thymus: it takes two to tango. *Immunol. Today* 14: 462-469.
- RODRIGUES, A.L.; REGNER, A.; RUBIN, M.A.; SOUZA, D.O. 1999. Effects of lead on adenylate cyclase activity in rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 24: 1037-1042.
- RONIS, M.J.; BADGER, T.M.; SHEMA, S.J.; ROBERSON, P.K.; TEMPLER, L.; RINGER, D.; THOMAS, P.E. 1998. Endocrine mechanisms underlying the growth effects of developmental lead exposure in the rat. *J. Toxicol. Environ. Health* 54: 101-120.
- RONIS, M.J.; BADGER, T.M.; SHEMA, S.J.; ROBERSON, P.K.; SHAIKH, F. 1996. Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136: 361-371.
- ROOK, G.A-W.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; LIGHTMAM, S.L. 1994. Hormones, peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. *Immunol. Today.* 15: 301-303.
- ROTHERBERG, S.J.; SCHNAAS, L.; CANSINO-ORTÍZ, S.; PERRONI-HERNÁNDEZ, E.; DE LA TORRE, P.; NERI-MÉNDEZ, C.; ORTEGA, P.; HIDALGO-LOPERENA, H.; SVENDSGAARD, D. 1989. Neurobehavioral deficits after low level lead exposure in neonates: the Mexico city pilot study. *Neurotoxicol. Teratol.* 11: 85-93.
- SABAG, N.; CASTRILLÓN, M.A.; TCHERNITCHIN, A. 1978. Cortisol induced migration of eosinophil leucocytes to lymphoid organ. *Experientia* 34: 666-667.
- SANDHIR, R.; JULKA, D.; GILL, K.D. 1994. Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacol. Toxicol.* 74: 66-71.

- SATA, F.; ARAKI, S.; TANIGAWA, T.; MORITA, Y.; SAKURAI, S.; NAKATA, A.; KATSUNO, N. 1998. Changes in T cell subpopulations in lead workers. *Environ. Res.* 76: 61-64.
- SATA, F.; ARAKI, S.; TANIGAWA, T.; MORITA, Y.; SAKURAI, S.; KATSUNO, N. 1997. Changes in natural killer cell subpopulations in lead workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 69: 306-310.
- SAVOLAINEN, K.M.; LOIKKANEN, J.; EERIKAINEN, S.; NAARALA, J. 1998. Interactions of excitatory neurotransmitters and xenobiotics in excitotoxicity and oxidative stress: glutamate and lead. *Toxicol. Lett.* 102-103: 363-367.
- SCHWARTZ, L.M.; OSBORNE, B.A. 1993. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol. Today* 14: 582-590.
- SELVIN-TESTA, A.; CAPANI, F.; LOIDL, C.F.; LOPEZ, E.M.; PECCI-SAAVEDRA, J. 1997. Prenatal and postnatal lead exposed induces 70 Kda heat shock protein in young rat prior to changes in astrocyte cytoskeleton. *Neurotoxicology* 18: 805-817.
- SHAFER, T.J. 1998. Effects of Cd²⁺, Pb²⁺ and CH₃Hg⁺ on high voltage-activated calcium currents in pheochromocytoma (PC12) cells: potency, reversibility, interactions with extracellular Ca²⁺ and mechanisms of block. *Toxicol. Lett.* 99:207-221.
- SIMON, H-U.; BLASER, K. 1995. Inhibition of programmed eosinophil death: a key pathogenic event for eosinophilia?. *Immunol. Today* 16: 53-55.
- SIMPSON, K.J.; LUKACS, N.W.; COLLETTI, L.; STRIETER, R.M.; KUNKEL, S.L. 1997. Cytokines and the liver. *J. Hepatol.* 27: 1120-1132.
- SMITH, D.R.; KAHNG, M.W.; QUINTANILLA-VEGA, B.; FOWLER, B.A. 1998. High-affinity renal lead-binding proteins in environmentally exposed humans. *Chem. Biol. Interact.* 115: 39-52.
- SPRY, C.J.F.; KAY, A.B.; GLEICH, G.J. 1992. Eosinophil 1992. *Immunol. Today* 13: 384-388.
- STEFFENSEN, I.L.; MESNA, O.J.; ANDRUCHOW, E.; NAMORK, E.; HYLLAND, K.; ANDERSEN, R.A. 1994. Cytotoxicity and accumulation of Hg, Ag, Cd, Cu, Pb and Zn in human peripheral T and B lymphocytes and monocytes *in vitro*. *Gen. Pharmacol.* 25: 1621-1633.
- STIMSON, W.H. 1988. Oestrogen and human T lymphocytes: presence of specific receptor in the T supresor/cytotox subset. *Scand. J. Immunol.* 28: 345-350.

- SUGAWARA E.; NAKAMURA, K.; MIYAKE, T.; FUKUMURA, A.; SEKI, Y. 1991. Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. *Br. J. Ind. Med.* 48: 239-242.
- SUN, X.; TIAN, X.; TOMSIG, J.L.; SUSZKIW, J.B. 1999. Analysis of differential effects of Pb²⁺ on protein kinase C isozymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156: 40-45.
- TANG, H.W.; HUEL, G.; CAMPAGNA, D.; HELLIER, G.; BOISSINOT, C.; BLOT, P. 1999. Neurodevelopmental evaluation on 9-month-old infants exposed to low level of lead in utero: involvement of monoamine neurotransmitters. *J. Appl. Toxicol.* 19: 167-172.
- TCHERNITCHIN, N.N.; VILLAGRA, A.; TCHERNITCHIN, A.N. 1998. Antiestrogenic activity of lead. *Toxicol. Water Qual.* 13: 43-53.
- TCHERNITCHIN, A.N.; TCHERNITCHIN, N.N. 1992. Imprinting of paths of heterodifferentiation by prenatal or neonatal exposure to hormones, pharmaceuticals, pollutants and other agents and conditions. *Med. Sci. Res.* 20: 391-397.
- TCHERNITCHIN, A.N.; CARTER, W.; SOTO, J.; BAUMANN, P. 1990. Effect of eosinophil-degranulating estrogens on spleen eosinophils and white pulp/red pulp ratio. *Agents and Actions* 31: 249-256.
- TCHERNITCHIN, A.N.; MENA, M.A.; SOTO, J.; UNDA, C. 1989. The role of eosinophils in the action of estrogens and other hormones. *Med. Sci. Res.* 17: 5-10.
- TCHERNITCHIN, A.N.; BARRERA, J.; ARROYO, P. MENA, M.A.; VILCHES, K.; GRUNERT, G. 1985. Degranulatory action of estradiol on blood eosinophil leukocytes *in vivo* and *in vitro*. *Agents and Actions* 17: 60-66.
- TCHERNITCHIN, A.N.; MENA, M.A.; RODRÍGUEZ, A.; MATURANA, M. 1985b. Localization of putative steroid receptor. Pertschuk, L.P. and Lee, S.H. (Eds). CRC Press. Boca Ratón. Florida. USA. 1: 5-37.
- TCHERNITCHIN, A.N.; CASTRILLÓN, M.A.; RODRÍGUEZ, A. 1984. Cellular distribution of dexamethasone in rabbit spleen and lymph nodes. *Agents and Actions* 15: 588-593.
- TIAN, L.; LAWRENCE, D.A. 1995. Lead inhibits nitric oxide production *in vitro* by murine splenic macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 132: 156-163.
- TIZARD, I.R. 1998. *Inmunología Veterinaria*. 5^{ta} Ed. McGraw-Hill Interamericana. México D. F. México. pp: 82-101.
- TONE, K.; SUZUKI, T.; TODOROKI, T.; MATSUI, S. 1991. Influence of lead on the host's defence mechanisms (I)--influence of lead on antibody production. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 64: 65-72.

- TONNER, L.E.; HEIMAN, A.S. 1991. Lead may affect glucocorticoid signal transduction in cultured hepatoma cells through inhibition of protein kinase C. *Toxicology* 119: 155-166.
- VALENTINO, M.; GOVERNA, M.; MARCHISEPPE, I.; VISONA, I. 1991. Effects of lead on polymorphonuclear leukocyte (PMN) functions in occupationally exposed workers. *Arch. Toxicol.* 65: 685-688.
- VAZIRI, N.D.; LIANG, K.; DING, Y. 1999. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney Int.* 56: 1492-1498.
- VIG, P.J.; PENTYALA, S.N.; CHETTY, C.S.; RAJANNA, B.; DESAIAH, D. 1994. Lead alters inositol polyphosphate receptor activities: protection by ATP. *Pharmacol. Toxicol.* 75: 17-22.
- VILLAGRA, R.; TCHERNITCHIN, N.N.; TCHERNITCHIN, A.N. 1997. Effect of subacute exposure to lead and estrogen on immature pre-weaning rat leukocytes. *Environ. Contam. Toxicol.* 58: 190-197.
- VINITZKY, R.E.; TAIBO, A.R. 1997. Factores de estrés y sarna roja canina. *Selecciones Vet.* 5: 5-17.
- VYSKOCIL, A.; FIALA, Z.; TEJNOROVA, Y.; TUSL, M. 1991. Stress reaction in developing rats exposed to 1% lead acetate. *Sb. Ved. Pr. Fak. Karlovy. Univ. Hradci. Kralove.* 34: 287-295.
- WADI, S.A.; AHMAD, G. 1999. Effects of lead on the male reproductive system in mice. *J. Toxicol. Environ. Health* 56: 513-521.
- WIEBE, J.P.; BARR, K.J.; BUCKINGHAM, K.D. 1988. Effect of prenatal and neonatal exposure to lead on gonadotropin receptors and steroidogenesis in rat ovaries. *J. Toxicol. Environ. Health* 24: 461-476.
- WIEMANN, M.; SCRIRMACHER, K.; BUSSELBERG, D. 1999. Interference of lead with the calcium release activated calcium flux of osteoblast-like cell. *Calcif. Tissue Int.* 65: 479-485.
- WINTER, D.; POLACEK, N.; HALAMA, I.; STREICHER, B.; BARTA, A. 1997. Lead-catalysed specific cleavage of ribosomal RNAs. *Nucleic. Acids Res.* 25: 1817-1824.
- YEO, Y.; LEE, W.T.; LAWRENCE, D.A. 1998. Differential effects of lead and cAMP on development and activities of Th1- and Th2- lymphocytes. *Toxicol. Sci.* 43: 172-185.
- YIIN, S.J.; LIN, T.H. 1995. Lead-catalyzed peroxidation of essential unsaturated fatty acid. *Biol. Trace Elem. Res.* 50: 167-172.

-ZELIKOFF, J.T.; SMIALOWICZ, R.; BIGAZZI, P.E.; GOYER, R.A.; LAWRENCE, D.A.; MAIBACH, H.I.; GARDNER, D. 1993. Symposium overview. Immunomodulation by metals. *Fundam. Appl. Toxicol.* 22: 1-7.

-ZWART, R.; VAN KLEEF, R.G.; MILIKAN, J.M.; OORTGIESEN, M.; VIJVERBERG, H.P. 1995. Potentiation and inhibition of subtypes of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by Pb²⁺. *Eur. J. Pharmacol.* 291: 399-406.