

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFECTO DEL ACIDO 2, 3-DIMERCAPTOSUCCINICO
EN LA PERMANENCIA TISULAR DEL PLOMO**

PRESENTA:

SILVIA GONZALEZ HERNANDEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA CELULAR**

MONTERREY, N. L.

SEPTIEMBRE DE 1997

TM

Z5320

FCB

1997

G6



1020119978

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO DEL ACIDO 2 3-DIMERCAPTOSUCCINICO
EN LA PERMANENCIA TISULAR DEL PLOMO**

PRESENTA

SILVIA GONZALEZ HERNANDEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA CELULAR**

MONTREY, N. L.

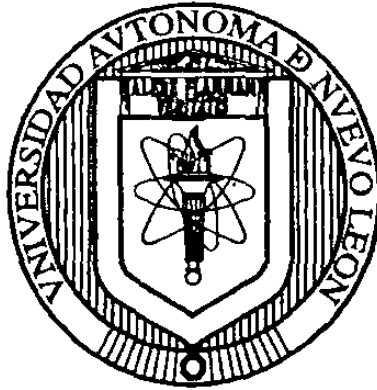
SEPTIEMBRE DE 1997

TM
25320
FCB
1997
56

0131 17660

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.



**EFFECTO DEL ACIDO 2,3-DIMERCAPTOSUCCINICO
EN LA PERMANENCIA TISULAR DEL PLOMO.**

Por

SILVIA GONZALEZ HERNANDEZ.

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad en
Biología Celular.

MONTERREY, N. L.

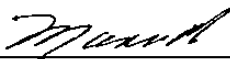
SEPTIEMBRE, 1997.



FONDO TESIS

**EFFECTO DEL ACIDO 2,3-DIMERCAPTOSUCCINICO
EN LA PERMANENCIA TISULAR DEL PLOMO.**

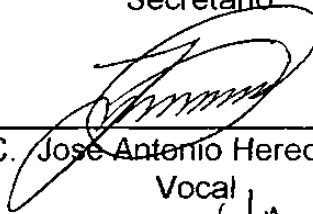
Comité de Tesis:



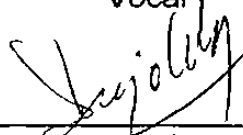
Dr. Mario R. Morales Vallarta.
Presidente



M.C. Graciela García Díaz.
Secretario



M.C. José Antonio Heredia Rojas.
Vocal



Dr. Diego González Ramírez.
Director de Tesis.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN:

La División de Farmacología del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, N. L., bajo la dirección del **Dr. Diego González Ramírez.**

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento al **Dr. Diego González Ramírez** por su paciencia, confianza y disponibilidad que siempre ha demostrado al orientarme en mi preparación profesional y principalmente por toda la ayuda que he recibido de él a quien admiro y respeto. Con mi mayor aprecio, muchas gracias por todo.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por el apoyo y las facilidades que me otorgaron para realizar este trabajo de investigación.

Al Dr. Mario R. Morales Vallarta, a la MC. Graciela García Díaz y al MC. José Antonio Heredia Rojas, a ellos un agradecimiento especial por su colaboración e interés en la revisión del presente trabajo, proporcionando valiosas sugerencias e incrementando la calidad del mismo.

Al IMSS y al CONACyT por el apoyo proporcionado en los proyectos FP-0038/163 y 2167-M9303, respectivamente.

Al MC. Miguel A. Zúñiga Charles, por sus consejos e importantes sugerencias en la revisión de la tesis.

AL MVZ. Gerardo Lozano Garza, por su colaboración en el manejo de los animales.

A todo el personal de la División de Farmacología del CIBIN que en su momento dado me brindaron su ayuda durante la realización de este trabajo.

Un agradecimiento especial a mis hermanas Sofía, Meche y Rocío porque me acompañan y apoyan en todo momento.

A mis Papás y a mis hermanos: Mary, Nico y David , que aún cuando me encuentro lejos me brindan su amor y confianza.

A todas aquellas personas que de alguna u otra forma he contado con su ayuda además de su amistad, MUCHAS GRACIAS.

*" Llegará un momento en que creas que todo ha terminado.
Ese será el principio "*

Louis L'Amour.

DEDICATORIA

A mis Padres:

Arcadio González Gloria y Felipa Hernández Molano.

A mis Hermanas:

Meche, Sofía, Marisol y Rocío.

Y a mis Hermanos:

Nico y David.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA-D	Deshidratasa del ácido δ -aminolevulínico.
ALA-U	Acido δ -aminolevulínico urinario.
ALT-S	Alanina-aminotransferasa en suero.
APDC	Pirrolidín ditiocarbamato de amonio.
BAL	Dimercaprol.
Ca	Calcio.
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado.
Ca ₂ NaEDTA	Sal cálcica-disódica del ácido etilendiaminotetraacético.
D.E.	Desviación Estándar.
dl	decilitro.
DMSA	Acido 2,3-dimercaptosuccínico.
DMPS	Acido 2,3-dimercaptopropan-1-sulfónico.
FDA	Food and Drug Administration.
Fig	Figura.
g	gramo.
Hb	Hemoglobina.
HNO ₃	Acido nítrico.
Hto	Hematocrito.
Kg	Kilogramo.
l	litro.
MIC	Metil isobutil cetona.

mg	miligramo.
ml	mililitro.
min	minuto.
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
nm	nanómetro.
25 (OH) ₂ D-1α-hidroxisilasa	25-hidroxivitamina D-1α-hidroxisilasa.
1,25(OH) ₂ D	1,25-hidroxivitamina D.
pH	<i>Potencial de Hidrógeno.</i>
Pb	Plomo.
PPF-IX	Protoporfirina IX eritrocítica.
Pb(NO ₃) ₂	<i>Nitrato de plomo.</i>
Pb-S	Plomo en sangre.
Pb-U	Plomo en orina.
psi	Unidad de presión.
PTH	Hormona paratiroidea.
SH	Sulfhidrilo.
%	Por ciento.
° C	Grado centígrado.
µg	microgramo.

LISTA DE TABLAS

Tabla No.	Página
1.- Parámetros biológicos monitoreados durante la semana de tratamiento con el DMSA en los diferentes grupos	47
2.- Efecto del DMSA (30 mg/Kg/día/5 días, vía oral) en indicadores de daño biológico a nivel urinario en animales intoxicados con Pb y alimentados con una dieta 0.1 % de calcio	48
3.- Efecto del DMSA (30 mg/Kg/día/5 días, vía oral) en indicadores de daño biológico en sangre en animales intoxicados con Pb y alimentados con una dieta 0.1 % de calcio	49
4.- Peso en gramo de los órganos: corazón, bazo, hígado, riñón y fémur de los diferentes grupos	50
5.- Influencia del DMSA en la movilización de Pb a nivel tisular ($\mu\text{g/g}$ de tejido) en ratas intoxicadas con este metal y alimentadas con una dieta 0.1 % de calcio.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.- Estructura del ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA)	17
2.- Complejo metal-quelante	18
3.- Composición de la dieta base (cero calcio)	27
4.- Curva de crecimiento de las ratas Sprague-Dawley	52
5.- Nivel de plomo urinario. Efecto del DMSA	53
6.- Acido δ -aminolevulínico urinario. Efecto del DMSA	54
7.- Nivel de plomo en sangre	55
8.- Protoporfirina IX eritrocítica	56
9.- Nivel de hemoglobina	57
10.- Nivel de hematocrito	58
11.- Concentración de plomo en corazón	59
12.- Concentración de plomo en bazo	60
13.- Concentración de plomo en hígado	61
14.- Concentración de plomo en riñón	62
15.- Concentración de plomo en fémur	63

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCION	Página
1.1	Plomo	1
1.2	Absorción y distribución del Pb	2
1.3	Pb y Calcio bajo	3
1.4	Efectos tóxicos del Pb	8
1.5	Tratamiento en las intoxicaciones por Pb	11
1.6	Características ideales de un agente quelante	13
1.7	BAL, CaNa ₂ EDTA y D-Penicilamina y sus efectos colaterales	13
1.8	Características farmacológicas del DMSA	15
1.9	Efectos colaterales del DMSA	19
1.10	Efectividad del DMSA a nivel tisular	19
1.11	Planteamiento del problema	22
2	HIPOTESIS	24
3	OBJETIVOS	
3.1	Objetivo general	24
3.2	Objetivos específicos	25
4	MATERIAL Y METODOS	
4.1	Diseño experimental	26
4.1.1	Preparación del alimento con 0.1 % de calcio	27
4.2	Etapas del estudio	
4.2.1	Etapa de adaptación	28
4.2.2	Etapa de intoxicación	28
4.2.3	Etapa de pausa	29
4.2.4	Etapa de tratamiento con DMSA	30
4.3	Obtención de muestras sanguíneas y tisulares al tiempo del sacrificio	
4.3.1	Sangre	31
4.3.2	Organos estudiados	33

	Página
4.3.2.1 Digestión ácida de tejidos por medio de microondas	33
4.4 Análisis de los datos	35
5 RESULTADOS	
5.1 Influencia de la dieta baja en calcio, Pb y DMSA en algunos parámetros biológicos	36
5.2 Efecto del agente quelante DMSA en indicadores de daño biológico	37
5.3 Comparaciones del peso (g) en corazón, bazo, hígado, riñón y fémur	40
5.4 Efecto del DMSA en la movilización de Pb tisular	41
6 DISCUSION	64
7 CONCLUSIONES	73
8 PERSPECTIVAS	74
9 LITERATURA CITADA	75

RESUMEN

El ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) es usado como agente quelante en las intoxicaciones por plomo (Pb). Actúa a nivel extracelular incrementando la eliminación del metal sin ocasionar efectos colaterales importantes para el organismo. Es sabido que una dieta baja en calcio en combinación con el Pb puede incrementar los efectos tóxicos de este. En el presente trabajo se estimó la eficacia del DMSA para reducir los niveles de Pb en tejido cardíaco, esplénico, hepático, renal y óseo en ratas Sprague-Dawley intoxicadas con este metal y mantenidas con una dieta 0.1 % Ca y en ratas testigo en donde una parte recibió dieta normal (1 % Ca) y la otra parte recibió dieta 0.1 % de Ca. Además se hizo la evaluación de algunos indicadores de daño biológico: ácido δ -aminolevulínico urinario (ALA-U), protoporfirina IX eritrocítica (PPF-IX), hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto), plomo en sangre (Pb-S) y en orina (Pb-U). Se les administró por vía oral DMSA en dosis de 30 mg/Kg/día durante 5 días a una parte de los animales intoxicados por Pb y al grupo testigo que recibió la dieta 0.1 % Ca. Se observó una reducción de Pb-S, ALA-U y PPF-IX acompañada de una eliminación importante de Pb-U, así como una recuperación en los niveles de Hb y Hto en el grupo intoxicado con Pb y mantenido con calcio bajo que recibió DMSA comparándolo con el grupo que no recibió el agente quelante. Se apreció una reducción muy significativa de Pb a nivel cardíaco, esplénico, hepático, renal y óseo del grupo tratado con DMSA en comparación con el grupo no tratado. Observamos que el DMSA es eficaz para aumentar la eliminación urinaria del metal del organismo con una reducción importante de la carga corporal del Pb en los diferentes órganos, así como una recuperación en los indicadores biológicos alterados en este modelo de intoxicación severa por Pb.

1 INTRODUCCION

1.1 Plomo

El plomo (Pb), es un metal pesado considerado muy tóxico para el organismo y al cual no se le ha encontrado ninguna función biológica en muchas especies estudiadas; ha tenido desde hace muchos años una gran demanda en la industria siendo utilizado en forma metálica (Quer-Brossa, 1983).

Este metal en su forma natural más común (sulfuro de Pb o galena) no representa un riesgo importante para el organismo, pero debido a sales y compuestos derivados por sus múltiples aplicaciones, se ha convertido en un elemento de considerable importancia en la contaminación ambiental ya que puede ser dispersado por el hombre durante los procesos de minería, fundición, procesamiento, uso y reciclado, y es considerado por lo tanto un contaminante ubicuo.

Las fuentes de riesgo al Pb son mayores a medida que se incrementa su uso en la industria; este metal se emplea importantemente en la fabricación de acumuladores eléctricos, como metal de imprenta, en pinturas, lacas, barnices, recubrimiento de cables eléctricos, soldaduras, esmaltado de alfarería, hule, juguetes, en aleación con el estaño (utilizado en la fabricación de papel de estaño), planchas de Pb para el techado de edificios, fabricación de municiones y artículos pirotécnicos, revestimiento anticorrosivo de recipientes y depósitos, producción de aceites pesados y plaguicidas,

contaminante en la elaboración ilegal de whisky, como antidetonante (tetrametilo y tetraetilo de Pb) en los carburantes utilizados por autos y otros vehículos, etc. (Quer-Brossa, 1983; Desoille et al., 1986; Dreisbach y Robertson, 1988).

Los compuestos de Pb responsables de la contaminación ambiental son en su mayor parte compuestos de tipo inorgánico. Se presentan en el aire y en los alimentos de áreas urbanas e industriales en cantidades lo suficientemente elevadas como para provocar efectos fisiopatológicos en ciertos organismos.

Durante mucho tiempo se han tratado de tomar medidas adecuadas para evitar la contaminación por el Pb, reduciendo los riesgos de su uso (tanto en el hogar como en la industria), o proporcionando un tratamiento eficaz para reducir los niveles de este metal cuando ha sido absorbido y está ejerciendo una acción tóxica, revirtiendo así los daños orgánicos en las personas que se encuentran intoxicadas.

1.2 Absorción y distribución del Pb

El Pb inorgánico puede ser absorbido al torrente sanguíneo en 2 formas: por inhalación o por ingestión (WHO, 1986; Ellenhorn y Barceloux, 1988; Lewis, 1990). Se distribuye rápidamente por el organismo llegando a órganos blanco como son hígado, riñón, médula ósea, etc., y se deposita en forma muy persistente en hueso. Cerca del 95 % de la carga corporal del Pb se encuentra en hueso; también se aprecia una alta concentración del metal en riñón considerado el principal órgano excretor y una parte menor en hígado y bazo (Moore et al., 1980; WHO, 1986; Klaassen, 1991). El Pb que se encuentra en

hueso es relativamente inerte pero puede regresar al torrente sanguíneo en condiciones relacionadas con el metabolismo de fósforo y calcio y el equilibrio ácido-base provocando así una variación en su eliminación sin modificar su absorción (Desoille et al., 1986). Este metal puede ser redistribuido en el esqueleto en áreas de mayor actividad metabólica, como son la tibia, el radio y el fémur (Goldfrank et al., 1990).

Los experimentos realizados por Conrad y Barton en 1978 mostraron que la absorción del Pb en animales ocurre a nivel de intestino delgado siendo el duodeno donde la bilis puede incrementar el transporte del metal a través de las células epiteliales de la mucosa intestinal. Generalmente, la absorción gastrointestinal del Pb en los adultos ocurre en un 10 %, mientras que en los niños pueden alcanzar hasta un 40 % aproximadamente (Ellenhorn y Barceloux, 1988; Klaassen, 1991). Algunos investigadores mencionan que ciertos factores fisiológicos se encuentran asociados con cambios en la absorción del metal. La absorción se puede elevar cuando es acompañada de una deficiencia de hierro, calcio y zinc. Se cree que el Pb y el calcio compiten probablemente por un mecanismo de transporte común (Toraason et al., 1981; Graef and Lovejoy, 1991; Klaassen, 1991).

1.3 Pb y calcio bajo

Desde hace muchos años se conoce la relación metabólica existente entre el calcio y el Pb; varios autores han mencionado que una deficiencia nutricional del calcio podría incrementar la severidad de los efectos del Pb en las funciones de un organismo (Aub et al., 1926; Six y Goyer, 1970; Mahaffey et al., 1973). En 1977, Meredith et al., confirmaron que la absorción del Pb

en el tracto gastrointestinal puede ser influenciado por la falta de ciertos componentes nutricionales en la dieta, en forma especial, el calcio.

Gerber y Deroo en 1975, mencionaron que algunos factores que intervienen en la dieta tales como el contenido de proteína y calcio podrían afectar la toxicidad del Pb, ellos observaron que una dieta baja en calcio en combinación con el Pb aumentaba la absorción de este a nivel de yeyuno en ratas jóvenes en comparación con ratas adultas. Así mismo, Quaterman et al., (1975) mencionaron que una reducción de calcio en la dieta de las ratas podría inhibir la liberación y excreción de Pb que se encuentra ya incorporado en el organismo.

Se sabe que el calcio es un elemento esencial para los organismos con una gran diversidad de funciones; principalmente es requerido para la función normal de la membrana, la coagulación sanguínea y la transmisión sináptica (Harper et al., 1980) donde el calcio está implicado en la liberación acoplada a estímulos de varios neurotransmisores (Silbergeld, 1977).

Además, el calcio junto con otros nutrientes sirve de elemento principal del tejido óseo en donde se almacena. Cuando se presenta una deficiencia en la dieta, se moviliza el calcio depositado en hueso para así mantener los niveles de calcio normal en la sangre y los tejidos (Dukes y Swenson, 1977).

Diversos estudios han demostrado que la vitamina D interviene en la homeostasis del calcio así como en la estimulación de una proteína de unión de calcio (Calbindina D) (Bogden et al., 1992; Halloran y DeLuca, 1980). Así mismo, cuando se presenta una alimentación deficiente en calcio, su

concentración en plasma disminuye induciendo la secreción de la hormona paratiroidea (PTH), la que estimula la actividad de la enzima renal específica 25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilasa [25(OH)₂D-1 α -hidroxilasa] para incrementar a nivel de plasma la 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D] y esta a su vez estimula el transporte de calcio activo en el intestino para ayudar a restaurar la pérdida de calcio en el plasma (Fox et al., 1977; Halloran y DeLuca, 1980; Fullmer y Rosen, 1990).

Existe un incremento en la carga corporal de Pb cuando es acompañado de una dieta baja en calcio así como de un aumento en la absorción del metal a nivel intestinal. Los estudios realizados en animales han mostrado que el Pb en la dieta puede disminuir la actividad de la 25(OH)₂D-1 α -hidroxilasa renal, con una disminución subsecuente de la 1,25(OH)₂D en circulación así como de la absorción de calcio intestinal (Fullmer y Rosen, 1990). Sorrell et al., (1976) mencionaron que este metal no inhibía a la PTH.

Se han diagnosticado casos de hipocalcemia en niños con un incremento de Pb en sangre acompañado de una reducción de la 1,25(OH)₂D en circulación debido tal vez a una disminución en la absorción de calcio a nivel intestinal (Toraason et al., 1981).

Hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto, pero existen algunas hipótesis que explican como se lleva a cabo la absorción del metal. Six y Goyer (1970) hicieron la observación de que el calcio podría afectar la retención y depositación del metal provocando con ello alteraciones mayores en el sistema renal y hematopoyético entre otros. Posteriormente, Kostial et al., (1971) mencionaron que se establecía una competencia entre el Pb y el calcio

por el transporte activo en el intestino de los animales de temprana edad. Por el contrario, los estudios de Barton et al., en 1978, mencionan que el Pb podía competir con el calcio por los sitios de unión con las proteínas de la mucosa intestinal. En 1981, Toraason et al., hicieron la observación de que el Pb como es un metal catiónico divalente, competía con el calcio sin que el organismo lo distinguiera ocurriendo la unión del metal al tejido duodenal e inhibiendo probablemente la absorción del calcio. Los estudios realizados por Fullmer y Rosen en 1990, confirman que el Pb inhibe el transporte de calcio intestinal cuando es acompañado de una dieta baja en calcio.

Los estudios de Mahaffey et al., en 1973, mostraron que las ratas alimentadas con una dieta baja en calcio presentaban una reducción muy significativa en el peso ganado en comparación con los que recibían una dieta normal en calcio.

A pesar de lo mencionado en la literatura, el mecanismo por el cual el Pb sustituye al calcio no ha sido confirmado completamente, únicamente se conoce que se incrementa la carga corporal del metal en el organismo durante una dieta hipocálcica (Six y Goyer, 1970). Se presenta un incremento significativo en la carga corporal del metal a nivel tisular así como de efectos patológicos en animales que reciben dietas con cantidades menores de calcio (Mahaffey et al., 1973), sugiriéndose que este tiene un efecto protector contra los efectos tóxicos del Pb. En 1978, Barton et al., hicieron la observación de que el calcio dietético no afectaba significativamente la absorción del Pb pero sí aumentaba la retención de este en el organismo disminuyendo su excreción, concordando en esto con lo planteado por Six y Goyer (1970).

Desde 1940, Lederer y Bing observaron que una dieta baja en calcio incrementaba el depósito del Pb en fémur cuando una solución de acetato de Pb fue incluida en la dieta, pero no afectó el contenido del metal cuando se administró esta solución de Pb por vía intraperitoneal. En 1974, Waldron y Stofen reportaron un incremento en los niveles del metal en los tejidos blanco y en hueso al presentarse una disminución en la concentración de calcio en la dieta. Algunos otros investigadores concordaron en que la combinación de calcio bajo y Pb podría incrementar la carga corporal del Pb en fémur y en riñón en comparación con una dieta normal (Six y Goyer, 1970; Mahaffey et al., 1973; Bogden et al., 1992).

La combinación de Pb y una dieta baja en calcio puede hacer que aumente el tamaño del riñón y que se observe una alta incidencia de cuerpos de inclusión intranuclear renal (Barton et al., 1978), así como también de una aminoaciduria (Six y Goyer, 1970). Levander (1979) hizo la observación de que las ratas que fueron intoxicadas con Pb y alimentadas con una dieta baja en calcio presentaban una elevada carga corporal del metal, con una severa anemia, una incrementada excreción urinaria de ácido δ -aminolevulínico y una alta presencia de cuerpos de inclusión intranuclear renal.

Los reportes de Bogden et al., en 1992 indican que el calcio en la dieta no influye en las concentraciones en órganos de metales divalentes como son el cobre, el hierro, el magnesio y el zinc. Los resultados presentados por Fullmer y Rosen en 1990 confirman que la relación entre el calcio dietético, la exposición al Pb y la síntesis de proteínas de unión de calcio ya sea renal e intestinal son complejas y que se encuentran relacionadas al metabolismo de la vitamina D.

1.4 Efectos tóxicos del Pb

En 1991, Graef y Lovejoy mencionaron que el mecanismo de la acción tóxica del Pb es compitiendo con metales esenciales como zinc o calcio en sus sitios de unión, y además, modificando la forma y función de las proteínas por su alta afinidad con los grupos -SH e interfiriendo con algunas enzimas celulares incluyendo aquellas implicadas en la hemosíntesis (Sánchez, 1977; Lewis, 1990). En concentraciones relativamente altas, el Pb puede alterar la estructura terciaria de las proteínas intracelulares, desnaturalizándolas y ocasionando muerte celular (Lewis, 1990; Graef y Lovejoy, 1991).

El Pb puede provocar anemia debido a las alteraciones del sistema hematopoyético y a una disminución en la vida media de los eritrocitos, incrementando la fragilidad mecánica de la membrana; no se sabe como ocurre este efecto pero es acompañado de una inhibición de la ATPasa dependiente de sodio y potasio de la membrana celular (Goyer, 1991).

Este efecto tóxico del Pb puede ocasionar una serie de alteraciones biológicas muy marcadas en el ciclo biológico humano. A nivel celular, el Pb interactúa con los grupos -SH en el sitio activo de varias enzimas que intervienen en la formación del hemo inhibiéndolas, produciendo un incremento de los precursores e impidiendo la incorporación de hierro en el grupo hemo (Goldfrank et al., 1990). El Pb inhibe la actividad de algunas enzimas como son: la deshidratasa del ácido δ -aminolevulínico, la ferroquelatasa y la coprogenasa, ocasionando una acumulación de ácido δ -aminolevulínico en plasma con un eliminación incrementada en orina, un aumento de coproporfirinógeno III celular y de la coproporfirina III en la orina y un

incremento en las tasas de protoporfirina IX de los hematíes y en los niveles de hierro sérico acompañado de una disminución en el proceso de formación del grupo hemo (Desoille et al., 1986). La protoporfirina IX incrementada en el eritrocito se une al zinc en lugar del hierro, produciendo una intensa fluorescencia al ser excitado apropiadamente siendo esto utilizado para medir su concentración y facilitar el diagnóstico de una intoxicación por Pb (Goyer, 1991).

Además de las alteraciones producidas por el Pb mencionadas anteriormente, el Pb causa daños renales que suelen manifestarse por un desorden tubular renal reversible y una nefropatía intersticial crónica (Klaassen, 1991) caracterizada por una esclerosis vascular, atrofia tubular, fibrosis intersticial y esclerosis glomerular (Goyer, 1991).

La inhibición del grupo hemo condiciona la serie de trastornos hemáticos del saturnismo. La plumbemia está caracterizada por un acortamiento de la vida media de los eritrocitos y hay además un bloqueo progresivo, funcional y reversible del mecanismo renal de depuración. En una exposición continua al Pb, el cuadro clínico incluye alteraciones sanguíneas (anemias), lesiones renales (uremia), trastornos digestivos (cólicos), lesiones neurológicas centrales o periféricas, etc. (Desoille et al., 1986).

Klaassen (1991), menciona que los procesos fisiológicos alterados en una intoxicación por Pb podrían estar divididos en varias categorías: los gastrointestinales, los neuromusculares, del sistema nervioso central, los hematológicos, y los renales, entre otros, ya sea separados o en combinación. Los síndromes neuromusculares y del sistema nervioso central usualmente

resultan de una exposición intensa, mientras que el síndrome abdominal es una manifestación de la intoxicación lenta e insidiosa.

Una exposición de Pb a dosis bajas puede provocar alteraciones en la síntesis del grupo hemo (Desoille et al., 1986) y en el metabolismo de la vitamina D (Bogden et al., 1992), así como ocasionar efectos neuroconductuales en niños (Klaassen, 1991), retraso en el desarrollo fetal y efectos cardiovasculares en adultos (Skerfving, 1988). Al presentarse una exposición muy grande de Pb, este puede provocar efectos gastrointestinales, anemia, nefropatía, anomalías electrocardiográficas, encefalopatía, y en ciertos casos abortos espontáneos e infertilidad en hombres (Lewis, 1990). Los efectos tóxicos del Pb son más severos a nivel de sistema nervioso central en los niños provocando alteraciones psicológicas y problemas en la conducta (Klaassen, 1991). El sistema nervioso periférico afectado por el Pb se manifiesta con una desmielinización segmentaria y degeneración axonal, la polineuropatía difusa resultante puede evolucionar a parálisis de algunos nervios (Ellenhom y Barceloux, 1988).

En los adultos ocupacionalmente expuestos al Pb, la sintomatología se presenta generalmente por un proceso abdominal agudo acompañado de cefalea, anemia, ataxia, pérdida de la memoria, así como de una neuropatía periférica localizada en extremidades superiores afectando al nervio radial con parálisis de los extensores de la mano del brazo dominante (Quer-Brossa, 1983; Graef y Lovejoy, 1991). En los niños expuestos al metal por la ingesta de sustancias no alimenticias (pica), se caracteriza por dolor abdominal, anemia, anorexia, ataxia y una encefalopatía difusa inespecífica (aparentemente el Pb pasa la barrera hematoencefálica más fácilmente en los

niños), convulsiones y coma, y la muerte en caso de presentarse edema cerebral severo (Ellenhorn y Barceloux, 1988; Graef y Lovejoy, 1991).

Los efectos tóxicos del Pb suelen llegar a ser muy variables y generalmente los niños y las mujeres embarazadas son más susceptibles que el resto de la población a una intoxicación por este metal. La intoxicación en un individuo dependerá de ciertos factores como: vía de ingreso, cantidad absorbida, tiempo de exposición, estado físico del individuo, higiene personal y el medio ambiente que lo rodea (Desoille et al., 1986). Debemos recordar que la deficiencia de ciertos elementos nutricionales como es el caso del calcio dietético puede aumentar la toxicidad clínica del Pb interviniendo en la absorción y retención de éste (Six y Goyer, 1970).

Los organismos en desarrollo son más susceptibles a la acción del Pb reflejándose en un efecto tóxico más acentuado en los diferentes sistemas importantes para el organismo, como son el sistema nervioso central, el sistema hematopoyético, y el renal, además de alterar el desarrollo en estos organismos.

1.5 Tratamiento en las intoxicaciones por Pb

En el humano, la intoxicación por Pb o saturnismo se encuentra caracterizada generalmente por varios signos y síntomas como son: cólico abdominal, constipación pertinaz con ocasionales episodios de diarrea, náusea, vómito, encefalopatía, polineuropatía, anemia, palidez, etc. (Levander, 1979; González et al., 1986). Se recomienda retirar a la persona del lugar de exposición y posteriormente si la sintomatología así lo justifica, iniciar un

tratamiento a base de alguno de los llamados agentes quelantes para eliminar el metal del organismo (Aposhian et al., 1995).

Muchos autores (p. ej. González et al., 1990) han mencionado que el objetivo principal en el tratamiento de una intoxicación por metales pesados es la eliminación de estos mediante el uso de sustancias llamadas **agentes quelantes**, los cuales tienen la finalidad de formar compuestos llamados quelatos con el metal y de esa forma eliminarlo más fácilmente del organismo (Molina et al., 1986) y son la mejor alternativa en la terapéutica de la intoxicación por metales, siendo en general moléculas compuestas de dos o más grupos electronegativos los cuales forman enlaces covalentes coordinados con el metal (Correia y Becker, 1991).

Correia y Becker (1991) consideran que la eficacia de los agentes quelantes radica en parte en el número de ligandos disponibles para unir al metal; entre mayor sea el número de ligandos, el complejo metal-quelante es más estable. Estos ligandos pueden contener grupos funcionales que pueden donar electrones para unirse al metal como son: -SH, -OH y -NH.

Los agentes quelantes que comunmente se han utilizado como tratamiento en las intoxicaciones por Pb pueden ocasionar diversos efectos colaterales que en algunos casos son de importancia, como el relacionado con su escasa especificidad al quelar metales esenciales como el calcio, zinc, cobre, etc., y su acción inhibitoria de enzimas importantes, por lo que se ha mantenido una búsqueda de nuevas alternativas en cuanto a fármacos que presenten las características farmacocinéticas como agentes capaces

de quelar metales pesados sin los efectos indeseables mencionados anteriormente.

1.6 Características ideales de un agente quelante

En Septiembre de 1994, un grupo de investigadores presentes en un simposium del National Institute of Environmental Health Sciences de los EUA, concordaron en que las características esenciales de un agente quelante son: 1) capacidad para reducir la carga del metal en las células en donde ejercen su acción tóxica, 2) capacidad para restaurar o prevenir la pérdida de la función celular provocada por el metal, 3) ausencia de efectos colaterales producidos por la interferencia en la homeostasis y en la utilización de elementos traza esenciales, y 4) sin o con poca toxicidad intrínseca (Goyer et al., 1995).

1.7 BAL, CaNa_2EDTA y D-Penicilamina y sus efectos colaterales

Existe una gran cantidad de agentes quelantes que se dejaron de utilizar hace tiempo en Estados Unidos y su uso ha disminuído debido a los efectos tóxicos observados en el organismo, pero se continúan utilizando en otros países como el nuestro, en el tratamiento de las intoxicaciones por Pb. Por ejemplo, uno de los primeros quelantes, utilizado durante la Segunda Guerra Mundial fue el **Dimercaprol** (British Anti-Lewisita, BAL), diseñado como antídoto de la lewisita (gas de guerra que contenía arsénico) basándose en que el arsénico tiene una afinidad por los grupos sulfhidrilo. Estudios farmacológicos revelaron que este compuesto podría además ser un protector contra los efectos tóxicos de metales pesados entre ellos el Pb, pero posteriormente en el tratamiento de las intoxicaciones por Pb se observó que

provocaba diversos síntomas en los individuos, tales como náuseas, vómitos, lagrimación, salivación y dolor de cabeza (Graziano et al., 1978; Goldfrank et al., 1990), además, en casos más graves podía ocasionar hipertensión y taquicardia (Correia y Becker, 1991).

Existen otros quelantes como la **sal cálcica-disódica del ácido etilendiaminotetraacético** (CaNa_2EDTA) utilizada en el tratamiento de las intoxicaciones por Pb así como por otros metales. Este quelante provoca la diuresis de zinc reduciendo sus niveles en plasma, además de incrementar la eliminación urinaria de hierro, cobre, cobalto y manganeso (Aposhian y Aposhian, 1990; Walker et al., 1992; Aposhian et al., 1995) requiriendo en ocasiones la suplementación en la dieta de estos iones (Flora y Tandon, 1990).

La **D-Penicilamina** (Cuprimine ®) considerada una alternativa al EDTA en la prueba de movilización del Pb y como tratamiento en una intoxicación crónica por este metal (González et al., 1990), ha sido usada para quelar metales tóxicos incluyendo cobre (Enfermedad de Wilson) así como mercurio y arsénico (Correia y Becker, 1991) pudiendo ocasionar reacciones de hipersensibilidad principalmente en persona alérgicas a la penicilina, presentándose como prurito intenso en antebrazos, edema peribucal, etc. (Goyer et al., 1995), además, en algunos casos se presenta anemia hemolítica, anorexia, náuseas y vómitos (Goldfrank et al., 1990).

1.8 Características Farmacológicas del DMSA

El **Acido 2,3-dimercaptosuccínico** (DMSA), un análogo del dimercaprol fue aprobado recientemente por la Food and Drug Administration de los EUA (FDA, U.S.) para el tratamiento oral de las intoxicaciones por Pb en adultos (Goyer et al., 1995) y en niños (Aposhian y Aposhian, 1990; Anonymous, 1991) (CDC, 1991) con niveles elevados de Pb en sangre.

Aposhian en 1983, hizo mención de los primeros reportes que se tuvieron de la utilización del DMSA, el cual originalmente fue utilizado como quelato de arsénico para el tratamiento de la esquistosomiasis (Friedheim et al., 1954), agregando que Liang et al., en 1957 en Shanghai, fueron los primeros en usarlo como antídoto en las intoxicaciones por metales pesados. Posteriormente, fue propuesto como tratamiento en las intoxicaciones por Pb por los años 60 utilizándolo clínicamente en la Republica Popular de China, Japón y Rusia. Transcurrieron varios años antes de empezar a realizar modelos experimentales con DMSA en el Occidente con el fin de demostrar su eficacia en las intoxicaciones por metales pesados.

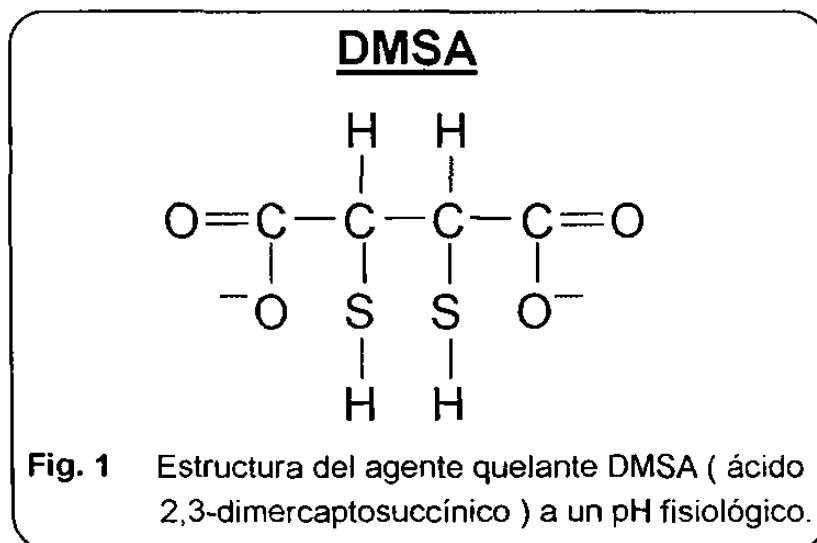
Aposhian (1983) menciona que primeramente se utilizó como un antagonista de mercurio en 1975 y posteriormente se utilizó como tratamiento eficaz en las intoxicaciones por Pb (Friedheim et al., 1978). Por varios años se realizaron diversos estudios en modelos animales a fin de comprobar la eficacia de este quelante. En 1989, la FDA (U.S.) lo registró y clasificó como una nueva droga, comercialmente conocido como Chemet ® (Sanofi Winthrop) y permitiendo su uso en las personas que presentaban niveles altos

de Pb en sangre, principalmente en los niños (Walker et al., 1992; Jones et al., 1994).

Todos los quelantes tienen la particularidad de que son moléculas compuestas de grupos electronegativos con la capacidad de formar complejos anulares mediante enlaces covalentes coordinados con los cationes metálicos siendo así eliminados estos más fácilmente del organismo (Adrien, 1981; Correia y Becker, 1991). Algunos quelantes tienen la capacidad de distribuirse tanto en el espacio extracelular como en el interior de la célula (Cory-Slechta et al., 1987) considerado esto una desventaja ya que pueden provocar la entrada del metal desde el exterior al interior de la célula en especial al sistema nervioso central incrementando la acción tóxica del metal.

El DMSA en cambio, tiene la particularidad de distribuirse extracelularmente. Su distribución en el espacio extracelular se debe a que es una molécula que al pH tisular se encuentra altamente ionizado en sus grupos carboxilos (ver Fig. 1) lo que impide su paso a través de la membrana celular dificultando así la entrada del metal en las células, por lo tanto, presenta una baja toxicidad comparada con otros quelantes tioles (Aposhian y Aposhian, 1990); otra ventaja de este análogo, es que siendo un compuesto hidrosoluble, se puede administrar por vía oral a diferencia de BAL el cual es soluble en aceite y sólo se administra por vía intramuscular. Esto representa una ventaja del tratamiento en comparación con el CaNa_2EDTA y el BAL, los cuales pueden distribuirse tanto intra como extracelularmente, y el BAL a diferencia del CaNa_2EDTA puede entrar más fácilmente a las células y ser biotransformado por ser una molécula más liposoluble (Aposhian et al., 1995).

El DMSA es un ácido débil con 4 hidrógenos ionizables (ver Fig. 1). Aposhian y Aposhian (1990) mencionan los estudios realizados por Egorova (1972) donde se midieron los 4 pKs existentes: $pK_1 = 2.31$, $pK_2 = 3.69$, $pK_3 = 9.68$ y $pK_4 = 11.14$, en donde los pKs con valor numérico más bajo son para los hidrógenos de los grupos carboxilos mientras que los pKs con valores numéricos más altos son para la disociación de los hidrógenos de los tioles. Rivera et al., (1989) señalaron que la solubilidad del complejo Pb-DMSA es dependiente del pH, siendo insoluble a pH de 1.0 - 7.1, pero soluble cuando los grupos carboxilo y tiol no coordinados están disociados.



Dreisbach y Robertson., en 1988 mencionaron que el Pb que se encontraba en el espacio extracelular en forma no combinada se unía con el quelante formando el complejo metal-quelante y de esta manera se eliminaba del organismo.

En 1989, Rivera et al., estudiaron el complejo metal-quelante mediante métodos de infrarrojo y potenciométricos determinando que el Pb se

coordinaba con un átomo de azufre y un átomo de oxígeno de la molécula de DMSA formando un compuesto cíclico y de esa forma se promovía su eliminación por vía urinaria principalmente (ver Fig. 2).



Graziano et al., (1978) compararon la acción del DMSA con otros quelantes, observando que el DMSA era mucho más efectivo que el BAL o que una combinación de este con CaNa₂EDTA (utilizados usualmente en combinación para la encefalopatía ocasionada por el metal), asimismo, fue más eficaz que la D-penicilamina. De hecho, la FDA (US) no aprueba el uso de la D-penicilamina como primera instancia (CDC, 1991) aún cuando se utiliza en algunos lugares como es el caso de nuestro país. Los estudios realizados por Jones et al., (1994) demostraron que el DMSA es significativamente más efectivo que el CaNa₂EDTA en la disminución de los niveles de Pb renal. Además, el DMSA no favorece la absorción del Pb desde el tracto gastrointestinal lo que sí ocurre con otros agentes quelantes (Kapoor et al., 1989).

1.9 Efectos colaterales del DMSA

Se han reportado pocos síntomas colaterales cuando se administra el DMSA, como son ligeras náuseas provocadas por el sabor algo desagradable debido a la presencia de sulfuros en el compuesto, erupciones mucocutáneas (Grandjean et al., 1991) y una eliminación de cobre y zinc considerada no importante clínicamente así como en algunos casos, de una ligera elevación reversible de la enzima alanina-aminotransferasa en suero (ALT-S) (Graziano et al., 1985; Aposhian y Aposhian, 1990; Grandjean et al., 1991). Al parecer es más selectivo que otros quelantes por lo que no se reporta una pérdida significativa de iones como zinc, calcio, hierro y cobre.

1.10 Efectividad del DMSA a nivel tisular

Graziano et al., (1978) reportaron que el DMSA en dosis de 100 mg/Kg administrado por vía oral o intraperitoneal en combinación con 1 μ Ci de Pb²¹⁰ redujo el Pb del hueso 4 días después de la terapia. Por otra parte, Cory-Slechta (1988) hizo la observación de que el DMSA no producía una disminución de Pb en hueso cuando administró el quelante por vía intraperitoneal en animales durante 5 días seguido de 4 meses de una exposición baja de Pb. Jones et al., en 1994, mencionaron que el DMSA produjo una reducción de sólo el 6 % en hueso en animales, no ocurriendo lo mismo con los niveles de Pb en cerebro y riñón en donde hubo una reducción del metal a menos de la mitad del grupo control. En 1995, Pappas et al., demostraron que el DMSA produjo una reducción de Pb en sangre, cerebro, riñón, e hígado en ratas, con una marcada diuresis del metal aún en una exposición continua de Pb. Aposhian y Aposhian (1990) mencionan que el

DMSA podría disminuir los niveles de Pb en sangre favoreciendo así la actividad de las enzimas bloqueadas, entre ellas la enzima deshidratasa del ácido δ -aminolevulínico, disminuyendo la excreción de su sustrato, el ácido δ -aminolevulínico (ALA) y aumentando la eliminación del metal por vía urinaria, además, se observó una disminución de la protoporfirina IX eritrocítica (PPF-IX).

Un punto muy importante a mencionar es que cinéticamente, el Pb se encuentra en la circulación sanguínea tanto en forma libre como asociado a los eritrocitos siendo esta forma reportada entre un 95 % (Ellenhorn y Barceloux, 1988) y un 99 % (Skerfving, 1988) y la forma libre se distribuye a diferentes tejidos blanco como son: riñón, hígado y aparato reproductor, estableciéndose un equilibrio dinámico entre la sangre y esos órganos. Posteriormente el Pb se almacena en tejido óseo (Correia y Becker, 1991) siendo eliminado principalmente por el riñón. Es conveniente señalar que el almacenamiento de Pb en el tejido óseo no es en un sólo compartimiento sino que parece haber más de un sitio donde se acumula el metal.

Al administrar quelantes hay una disminución inicial en los niveles de Pb en sangre pero esta es seguida usualmente por un regreso a los niveles previos (rebote) al suspender el tratamiento, estableciéndose un nuevo equilibrio entre los órganos y la sangre, por lo que la eliminación del metal por el DMSA dependerá del gradiente de concentración de Pb establecido desde el tejido a la sangre, compartimiento en donde el DMSA se une al Pb (Walker et al., 1992).

Como se ha mencionado anteriormente, los agentes quelantes provocan diversos efectos, pero algunos, como el CaNa_2EDTA puede promover una redistribución del Pb a hígado y cerebro (Cory-Slechta et al., 1987); otra acción tóxica de estos compuestos se encuentra en el riñón y puede provocar ahí una vacuolización tubular proximal, con una pérdida del borde en cepillo y una posible degeneración tubular (Klaassen, 1991). Otros, como la D-penicilamina, presentan efectos renales con la posible producción de un síndrome nefrótico o de Goodpasture (Walker et al., 1992).

Una ventaja adicional del DMSA en comparación a otros quelantes es que no causa redistribución del Pb al cerebro al ser administrado en ratas intoxicadas con el metal (Cory-Slechta, 1988) siendo menos tóxico de acuerdo a las determinaciones de la DL_{50} en ratones y otros animales (Aposhian, 1983).

En estudios realizados por Zhao-Fa y Jones (1988), el DMSA y el ácido 2,3-dimercaptopropan-1-sulfónico (DMPS) (análogo del BAL y recomendado en las intoxicaciones por Pb y mercurio) resultaron más efectivos que el BAL y el CaNa_2EDTA . Su uso podría reducir las etapas de terapia diseñadas para una intoxicación por Pb en estudios toxicológicos. Además, reducen más eficazmente los niveles de Pb en riñón y en cerebro, considerando más prometedor al DMSA en las intoxicaciones por Pb por su mejor aprovechamiento en comparación con el DMPS.

Klaassen (1991) considera que un agente quelante ideal deberá ser soluble en agua, resistente a la biotransformación, capaz para alcanzar los sitios de almacén del metal, incapaz de formar compuestos tóxicos con los

metales, que mantenga su actividad quelante a pH corporal y que sea fácil su excreción del organismo.

1.11 Planteamiento del Problema

Anteriormente (González, 1994), diseñamos un modelo piloto de intoxicación por Pb en un grupo relativamente pequeño de animales recién destetados y alimentados con diferentes dietas bajas en calcio a fin de elegir la dieta a la cual no se presentara una disminución en el índice de sobrevivencia de estos animales. Como resultado de ese estudio preliminar, se seleccionó la dieta de 0.1 % de calcio y en combinación con Pb se midieron los distintos cambios sufridos en los niveles de Pb en sangre, Pb en orina, ácido δ -aminolevulínico urinario y de otros indicadores de menor sensibilidad como es la hemoglobina y el hematocrito, y al administrar DMSA se observó una recuperación muy importante en algunos de estos indicadores.

El uso del DMSA en los humanos aún se encuentra con ciertas limitaciones debido a estudios farmacocinéticos aún incompletos. Es necesario reforzar los conocimientos relacionados con la eficacia del DMSA para que en un momento dado pueda ser utilizado en las intoxicaciones por Pb especialmente en sectores de población más susceptibles a una exposición por este metal y que sea considerado por la comunidad médica ya que simplifica el tratamiento al ser administrado por vía oral y no requerir necesariamente de hospitalización como ocurre con otros quelantes como el CaNa_2EDTA y el BAL.

Al establecer nuestro diseño experimental y conforme a lo comunicado en la literatura, tratamos de probar la efectividad del DMSA en animales de

experimentación que se encuentran en condiciones de intoxicación subcrónica con Pb y de alimentación deficiente en calcio con el propósito de hacer más severa la intoxicación y así estimar la acción del agente quelante tanto en la disminución de la concentración del metal de los tejidos que se ven afectados comúnmente, como al mismo tiempo medir la cantidad de Pb atrapado en ellos. En este estudio también se pretendió establecer una posible correlación entre los altos niveles acumulados del metal en los tejidos y las alteraciones en los marcadores biológicos como: elevación de protoporfirina IX eritrocítica, excreción del ácido δ -aminolevulínico urinario, y cambios en los niveles de hemoglobina y de hematocrito. Todo ello provocado por la acción quelante del DMSA que actúa principalmente en el compartimiento extracelular.

2 HIPOTESIS

El DMSA es un agente quelante eficaz por vía oral para reducir los niveles de Pb en tejido renal, hepático, esplénico, cardíaco y óseo en animales intoxicados con este metal y mantenidos con una dieta baja en calcio siendo posible relacionar la eficacia de este quelante para reducir los niveles tisulares de Pb con cambios benéficos en los niveles de algunos indicadores biológicos como son: Pb-S, PPF-IX, Hb, Hto, Pb-U y ALA-U.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Demostrar que el DMSA es eficaz en casos severos de intoxicación por Pb mediante la reducción de la carga corporal del Pb presente en tejido renal, hepático, esplénico, cardíaco y óseo en animales intoxicados con este metal al mantenerlos con una dieta baja en calcio. Al mismo tiempo, observar una recuperación favorable de algunos indicadores de daño biológico, como son: Pb-S, PPF-IX, Hb, Hto, Pb-U y ALA-U.

3.2 Objetivos Específicos

- 1.- Estimar la cantidad de Pb eliminado en la orina (Pb-U) antes y durante la administración oral del DMSA en animales intoxicados con el metal comparándolo con aquellos que no recibieron el tratamiento con el quelante.
- 2.- Cuantificar el ácido δ -aminolevulínico urinario (ALA-U) eliminado en los animales intoxicados con Pb antes y durante el tratamiento con el DMSA comparándolo con los que no recibieron el agente quelante.
- 3.- Evaluar los niveles de hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto) y protoporfirina IX eritrocítica (PPF-IX), así como de plomo en sangre (Pb-S) en las condiciones experimentales propuestas para realizar una comparación entre los animales intoxicados con el metal, los que recibieron el DMSA más el Pb y los que no fueron intoxicados con Pb.
- 4.- Medir la carga corporal de Pb presente en tejido renal, hepático, esplénico, cardíaco y óseo (fémur) en los animales intoxicados subcrónicamente que recibieron la administración de DMSA para posteriormente compararlo con los que no recibieron el tratamiento, tanto en grupo intoxicados como en los grupos que no recibieron el Pb.

4 MATERIAL Y METODOS

4.1 Diseño Experimental

De acuerdo al planteamiento del problema, se utilizaron en este modelo de intoxicación subcrónica por Pb, 54 ratas macho Sprague-Dawley, recién destetadas, con un peso promedio inicial entre 60 y 70 gramos. Los animales se dividieron al azar en 2 grupos testigo y 2 grupos problema y fueron mantenidos en las primeras etapas del experimento en jaulas de acero inoxidable para posteriormente alojarlos individualmente en jaulas metabólicas (Nalgene) hasta el término del estudio.

Los animales fueron divididos en 4 grupos: el primer grupo (7 ratas) recibió una dieta 1 % de calcio (Purina 5001; Laboratory Rodent Diet) y no fue intoxicado con Pb (grupo **Normal**); el segundo grupo (7 ratas) recibió dieta con 0.1 % de calcio (Teklad, ver Fig. 3) y que tampoco fue intoxicado con Pb pero que recibió el tratamiento con el agente quelante (grupo **0.1 % Ca-DMSA**); al tercer y cuarto grupos, **Pb-Sin DMSA** (20 animales) y **Pb-DMSA** (20 animales) respectivamente, se les dió la misma dieta baja en calcio pero recibieron ambos como líquido para beber *ad libitum* durante 4 semanas una solución de nitrato de plomo [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0.2 %; 0.8 mmol/l] y posteriormente se aplicó a uno de ellos un tratamiento a base del agente quelante DMSA (30 mg/Kg/día/5 días; 1.8 mmol/l), dejando sin tratamiento con el agente quelante al otro grupo

COMPOSICION DE LA DIETA BASE

CONTENIDO	g/Kg
Caseina	207.0
DL-Metionina	3.0
Sacarosa	499.12
Fécula de maíz	150.0
Aceite de maíz	50.0
Celulosa (fibra)	50.0
Mezcla de minerales	13.37
(Deficiente en Ca-P)	
Fosfato de sodio monobásico	8.9
Fosfato de potasio monobásico	8.6
Mezcla de vitaminas	10.0
Etoxiquina (antioxidante)	0.01

Fig. 3 Composición de la dieta cero calcio. Mezcla de minerales (g/Kg de dieta): NaCl, 193.7325; K₂SO₄, 136.1363; MgO, 62.8322; KIO₃, 0.0262; Na₂SeO₃.5H₂O, 0.0262; CrK(SO₄)₂.12H₂O, 1.4399; ZnCO₃, 4.1888. Mezcla de vitaminas (mg/Kg de dieta): ácido p-aminobenzoico, 110.1; ácido ascórbico, 1016.6; biotina, 0.44; vitamina B12, 29.7; pantotenato de calcio, 66.1; ácido fólico, 1.98; inositol, 110.1; niacina, 99.1; riboflavina, 22; tiamina, 22; piridixina, 22; vitamina D3, 4.4; vitamina E, 242.3. Harlan Teklad (Madison, Wisconsin).

4.1.1 Preparación del alimento con 0.1 % de calcio

El alimento bajo en calcio (0.1 %) se preparó a partir del alimento en polvo especial de Harlan Teklad (Madison, Wisconsin) (ver Fig. 3) el cual no contiene calcio pero contiene el resto de los componentes de una dieta normal. A este alimento se le adicionó Cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂. 2H₂O; Baker) para lograr una concentración de 0.1 % de calcio.

4.2 Etapas de estudio

El estudio se clasificó en 4 etapas: Adaptación, Intoxicación, Pausa y Tratamiento con el Agente Quelante las cuales se desarrollaron como sigue:

4.2.1 Etapa de Adaptación

Esta etapa consistió en la adaptación de los animales a las condiciones de laboratorio (una semana de duración). Todos los animales fueron recibidos del bioterio, pesados y alojados en jaulas de acero inoxidable en forma individual e iniciaron la dieta correspondiente para cada grupo (0.1 % para los grupos 0.1 % Ca-DMSA, Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA y 1 % de calcio para el grupo Normal) manteniéndose durante las 7 semanas que duró el experimento (se realizaron varios estudios con grupos de 10 animales con períodos de 7 semanas de duración hasta que se completó el número total de animales). En esta primera semana se les dió de beber agua desionizada en biberones de vidrio de 100 ml, y se midió el volumen ingerido diariamente, todos los animales se pesaron el primer día de cada semana, se les dió alimento y bebida *ad libitum* y se mantuvieron en períodos constantes de luz/obscuridad durante el estudio.

4.2.2 Etapa de Intoxicación

En la segunda semana se inició la intoxicación con Pb, se administró al grupo Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA una solución acuosa al 0.2 % de $Pb(NO_3)_2$ (Baker) en forma oral durante 4 semanas. Los grupos Normal y 0.1 %

Ca-DMSA prosiguieron con el agua desionizada. Al término de la 5ª semana se suspendió la administración de Pb.

4.2.3 Etapa de Pausa

La 6ª semana es la que llamamos etapa de Pausa y en ella se suspendió la administración de Pb y los animales intoxicados recibieron nuevamente agua desionizada para beber. A partir de esta semana, los animales se alojaron individualmente en jaulas metabólicas (Nalgene) especiales para separar las heces y la orina. Se colectó la orina emitida diariamente, con el propósito de determinar los niveles de Pb en orina (Pb-U) y ácido δ -aminolevulínico urinario (ALA-U). Además, se realizó la valoración semicuantitativa de algunos indicadores bioquímicos comunes como son: pH, proteína, sangre, cetona y bilirrubina (tiras reactivas Bili-Labstix, Ames).

El Pb en orina (Pb-U) se determinó por espectroscopía de absorción atómica de flama por la técnica de extracción (Hessel, 1968; Zinterhofer et al., 1971) como sigue: se ajustó el pH de la muestra a 5.5 con ácido acético glacial utilizando un potenciómetro (Corning modelo 12). Se agregó 1 ml de Tritón X-100 (Sigma) al 5 % a 5 ml de muestra (para destruir elementos formes presentes en la orina), el metal liberado fue quelado con 1 ml de pirrolidín ditiocarbamato de amonio al 2 % (APDC; Sigma) y extraído con 5 ml de metil isobutil cetona (MIC; Baker). Al añadir cada reactivo, la muestra se agitaba vigorosamente con un Vortex (Scientific Industries) y durante 10 min se mantuvo en un agitador mecánico (Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific), posteriormente se centrifugó para separar el

extracto y analizarlo en un espectrofotómetro de absorción atómica de flama (Perkin-Elmer, Modelo 5000).

Se determinó el ácido δ -aminolevulínico urinario (ALA-U) por el método modificado de Davis y Andelman (1967) de la siguiente forma: se ajustó la muestra de orina a un pH de 5.5 y fue pasada a través de unas columnas preparadas con resinas de intercambio catiónico y aniónico (AG[®] 50W-X2 de 200 a 400 mallas en forma de hidrógeno y AG[®] 1-X2 de 200 a 400 mallas en forma de acetato, respectivamente; Laboratorios Bio Rad) para remover sustancias interferentes, principalmente porfobilinógeno y urea. Las columnas fueron lavadas con H₂O desionizada varias veces antes y después de pasar la muestra. Se desechó la columna aniónica y a la columna catiónica se le añadió acetato de sodio 1.0 M (Baker) para recuperar el ALA, este ácido se condensó con 0.2 ml de acetyl acetona (Merck) se dejó en baño maria (Thermolyne Dri-Bath, CTR) durante 10 min y el pirrol formado reaccionó con el reactivo modificado de Ehrlich (relación 1:1), produciendo un compuesto colorido cuya intensidad fue medida 15 min después en un espectrofotómetro Beckman (Modelo DU 650i) a 553 nm.

4.2.4 Etapa de Tratamiento con DMSA

La 7^a semana del estudio es la que llamamos etapa de Tratamiento, en donde un grupo de animales recibió la administración del agente quelante DMSA (Sigma) que se administró por vía oral en dosis de 30 mg/Kg/día, durante 5 días. El quelante fue diluido previamente en 5 ml de una solución alcalina de NaHCO₃ 0.5 M (Baker) y aforada con agua desionizada ajustándose el pH de la solución a 7.5. El tratamiento se preparó diariamente

y se dió de beber en biberones de 100 ml a los grupos 0.1 % Ca-DMSA y Pb-DMSA; el resto de los animales sólo recibieron agua desionizada para beber. Se colectó la orina diariamente y se midieron todos los indicadores mencionados anteriormente (Pb-U, ALA-U e indicadores en tira reactiva).

Anteriormente, se había hecho un estudio con un modelo piloto en 3 grupos de animales para probar la disolución del agente quelante con 3 valores de pH: 2.5, 7.5 y 8.5 y elegir el más adecuado. A un primer grupo de animales se les administró el DMSA disuelto únicamente en H₂O desionizada (pH 2.5), al segundo grupo se le administró el DMSA disuelto en un pequeño volumen de NaHCO₃ 0.5 M ajustando el pH a 7.5 y un tercer grupo se les administró el quelante disuelto completamente en NaHCO₃ 0.5 M (pH 8.5). Para el estudio se eligió el pH de 7.5 ya que resultó ser el más adecuado para los animales.

4.3 Obtención de muestras sanguíneas y tisulares al tiempo del sacrificio

4.3.1 Sangre

Al término de la semana de tratamiento con el quelante, todos los animales se sacrificaron. Las ratas fueron anestesiadas con éter etílico (Baker), se les hizo una incisión longitudinal en la parte ventral media y con una jeringa hipodérmica estéril y heparinizada previamente se realizó una punción en la aorta dorsal para la toma de 10 ml de sangre aproximadamente a fin de efectuar las siguientes pruebas: hematocrito (Hto), hemoglobina (Hb), protoporfirina IX eritrocítica (PPF-IX) y Pb en sangre (Pb-S).

La determinación de hematocrito (Hto) (Lynch et al., 1972): esta consistió en la prueba de microhematocrito. La sangre venosa se aspiró en tubos capilares heparinizados, sellándose un extremo con plastilina y se centrifugó por 5 min en una microcentrífuga (Clay Adams) y posteriormente se leyó en un lector de hematocrito (Sol-Bat).

La determinación de hemoglobina (Hb) por el método de conversión a cianometahemoglobina (Lynch et al., 1972) consistió en diluir 0.02 ml (20 mm³) de sangre con una pipeta de Sahli en 5 ml del reactivo de Drabkin. Después de 10 minutos la densidad de la luz se midió con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Coleman 55 a 540 nm. La Hb presente se transformó en cianometahemoglobina mediante la adición de ferrocianuro de potasio y cianuro de sodio, siendo la densidad del color producido directamente proporcional a la cantidad de Hb presente.

La protoporfirina IX eritrocítica (PPF-IX) se analizó por hematofluorometría (Blumberg et al., 1977) en un hematofluorómetro (Buchler, Hemafluor™ ZP). La técnica consistió en la medición directa en una gota de sangre previamente heparinizada y oxigenada antes de su lectura; se colocó una gota de sangre en un cubreobjetos evitando formar burbujas y fue introducido en el compartimiento del equipo. Las protoporfirinas son excitadas a 424 nm emitiendo una fluorescencia de 594 nm, siendo la cantidad de fluorescencia proporcional a la concentración de protoporfirina.

El Pb-S al igual que Pb-U se determinó por espectroscopía de absorción atómica de flama por la técnica de extracción (Hessel, 1968; Zinterhofer et al., 1971).

4.3.2 Organos estudiados

Al concluir con la toma de sangre de la aorta se prosiguió a realizar la disección de diferentes órganos de cada uno de los animales, como son: hígado, riñón, bazo, fémur y corazón. Todos los órganos se pasaron a solución salina para posteriormente guardarlos en frascos de polietileno etiquetados y almacenarlos en congelación (-20°C) hasta su posterior procesamiento.

A cada uno de los órganos extraídos se les retiró el tejido graso, fibroso y muscular en caso del fémur y se pesaron cada uno de los órganos para posteriormente determinar la concentración de Pb por medio de la espectrofotometría de absorción atómica de flama previa digestión de los tejidos.

4.3.2.1 Digestión ácida de tejidos por medio de microondas

La digestión de los diferentes tejidos se llevó a cabo en un sistema de digestión por microondas (MDS-2000, CEM), el cual consiste en un sistema cerrado equipado con una serie de vasos de teflón PFA resistente a altas presiones (120 psi \pm 10; 830 kPa) (Gilman y Engelhart, 1989). En este sistema las reacciones fueron monitoreadas y controladas utilizando un controlador de presión y temperatura incluidos en el aparato. El sistema posee un microprocesador en donde se almacenan los métodos realizados para cada tejido, y de donde se seleccionan algunos parámetros como son: potencia, control de presión para cada una de las etapas de digestión, tiempo de permanencia a la presión, tiempo total de corrida y velocidad de extracción de vapores.

Se montó y caracterizó la técnica para la digestión ácida por microondas, en donde se utilizaron presiones de 120 psi con varias etapas de calentamiento por microondas a fin de obtener una mejor digestión de los órganos y poder eliminar los posibles compuestos orgánicos en la muestra. Se colocó en cada uno de los vasos de teflón 0.5 g aproximadamente de muestra y se añadieron 5 ml de HNO₃ suprapuro (Merck), se sellaron los vasos y se introdujeron en el digestor. Las condiciones del digestor se programaron en 4 etapas en caso de riñón, hígado, bazo y corazón en donde se fue elevando la presión en forma escalonada hasta alcanzar 120 psi con 100 % de poder en un tiempo de 40 min, en cambio para hueso se programó la digestión en 5 etapas con 50 % de poder alcanzando una presión de 120 psi en un tiempo de 70 min. Después de la digestión, dejamos que la presión bajara hasta cerca de 30 psi y los vasos se enfriaran, en estas condiciones se retiraron los vasos del digestor llevándose a una campana de extracción y se procedió a abrirlos para liberar los vapores; la muestra digerida se recuperó en frascos de polietileno perfectamente limpios y debidamente etiquetados.

El Pb en tejido se determinó también por la técnica de extracción utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica de flama; fue necesario hacer un ajuste del pH a 5.5 de la muestra digerida con una solución saturada y otra diluída de NaOH (Baker) para tener una mejor recuperación, posteriormente se aforó a un volumen conocido dependiendo de la concentración de Pb en la muestra y se cuantificó el Pb presente por la técnica de extracción descrita anteriormente (Hessel, 1968).

4.4 Análisis de los Datos

El análisis de los datos fue realizado utilizando el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) para PC versión 4.0 en una computadora IBM. Se utilizaron procedimientos descriptivos (media y desviación estándar) e inferenciales.

Todas las variables estudiadas en los grupos: Normal, 0.1 % Ca-DMSA, Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA fueron medidos en una escala de intervalo. A los datos así obtenidos se les aplicó la prueba de Shapiro-Wilkins para probar si los datos tenían, o se aproximaban a una distribución normal y la prueba de Bartlett para determinar la homogeneidad de las varianzas. Se utilizó Análisis de Varianza de una vía (ANOVA de una vía), paramétrica, para analizar las variables que cumplieran con los requisitos anteriores y la prueba de Kruskal-Wallis, no paramétrica, para analizar variables cuyos datos no tenían distribución normal y varianzas homogéneas. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los grupos por cualquiera de las dos pruebas estadísticas anteriores, los grupos que difirieron fueron detectados por las pruebas de comparación múltiple de Tukey (paramétrica) o tipo Tukey no paramétrica (Zar, 1984).

5 RESULTADOS

5.1 *Influencia de la dieta baja en calcio, Pb y DMSA en algunos parámetros biológicos*

La Tabla No.1, muestra los parámetros biológicos monitoreados durante la semana de tratamiento con el DMSA en los grupos: Normal, 0.1 % Ca-DMSA, Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA. El grupo que recibió la dieta baja en calcio de 0.1 % en combinación con el DMSA no provocó una disminución en el porcentaje de sobrevivencia de los animales ($n = 7$) comparado con el grupo que recibió la dieta normal de 1 % en Ca ($n = 7$), pero sí hubo una reducción significativa ($p < 0.05$) en el peso total del grupo que recibió 0.1 % Ca-DMSA (194 ± 56 g) con respecto al grupo Normal (294 ± 54 g). La eliminación de orina fue mayor en el grupo Normal (13.9 ± 2.9 ml) que en el grupo 0.1 % Ca-DMSA (5.8 ± 1.4 ml) con un pH urinario de 7.5 ± 0.3 y 5.9 ± 0.2 , respectivamente. Dentro de la misma tabla podemos apreciar niveles detectables en forma semicuantitativa de algunas sustancias eliminadas en orina como son proteína, sangre, cetona y bilirrubina por medio de tiras reactivas. En el grupo Normal fue detectada proteína a nivel de trazas (aproximadamente 15 mg/dl) en 3 de 7 animales y en el grupo 0.1 % Ca-DMSA, 3 de 7 animales presentaron una cruz (equivalente a 30 mg/dl). También se detectó sangre eliminada en la orina marcado con una cruz (rango de 0.015-0.062 mg/l) en 2 animales del grupo Normal y 1 del grupo 0.1 % Ca-DMSA. En 4 animales del grupo Normal se encontraron niveles de cetonas con una sensibilidad de 15 mg/dl señalado por una cruz. No fueron detectados niveles de bilirrubina en el grupo Normal y 0.1 % Ca-DMSA.

En la misma tabla podemos observar los cambios que se produjeron entre los grupos Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA así como la comparación con los grupos Normal y 0.1 % Ca-DMSA. El porcentaje de sobrevivencia disminuyó hasta un 95 % en el grupo Pb-Sin DMSA ($n = 19$) en comparación con el grupo Pb-DMSA ($n = 20$). En el peso corporal total del grupo intoxicado con Pb (Pb-Sin DMSA) se observó una reducción con una media de 138 ± 53 g con respecto al grupo Pb-DMSA (158 ± 66 g) sin ser significativa la diferencia ($p > 0.05$), pero sí se apreció una diferencia significativa de ambos con respecto al grupo Normal ($p < 0.05$). La eliminación de orina tanto en el grupo Pb-Sin DMSA (22.1 ± 7.1 ml) y Pb-DMSA (27.5 ± 9.7) fue mucho más alta comparada con los grupos Normal y 0.1 % Ca-DMSA, presentando una acidez de 6.2 ± 0.5 y 6 ± 0.2 , respectivamente. Dentro de las sustancias eliminadas en la orina se detectaron niveles trazas de proteína en el grupo Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA en 7 de 19 y 10 de 20 animales, respectivamente. Los niveles de sangre urinaria en el grupo Pb-Sin DMSA se observaron en trazas en 7 animales y una cruz en 3 animales, y en el grupo Pb-DMSA 10 animales marcaron niveles de trazas y una cruz en 2 animales. La presencia de cetonas en ambos grupos con y sin el DMSA fue de 8 animales a nivel de trazas en mg/dl. En estos grupos sí se detectó bilirrubina a nivel de trazas (6 animales) y una cruz (2 animales) con una detección de 0.8 mg/dl en el grupo Pb-Sin DMSA, y en el grupo Pb-DMSA se detectaron 3 animales con trazas y 6 con una cruz.

5.2 Efecto del agente quelante DMSA en indicadores de daño biológico

Podemos observar en la Tabla No. 2 el efecto del DMSA en la eliminación urinaria de Pb y ALA en los distintos grupos en estudio (media \pm

desviación estándar). Entre el grupo Normal y el de 0.1 % Ca-DMSA, los niveles de Pb presentes en orina tuvieron una media de 95.6 ± 31.2 y 90 ± 28.3 $\mu\text{g/l}$, respectivamente en los cuales no se apreció una diferencia significativa entre ambos ($p > 0.05$). La eliminación de Pb en el grupo Pb-Sin DMSA fue menor (950 ± 37 $\mu\text{g/l}$) en comparación con el grupo Pb-DMSA donde podemos observar que se incrementó la eliminación de este metal a $4,275 \pm 36$ $\mu\text{g/l}$ siendo diferentes significativamente ($p < 0.05$), además, se apreció una diferencia significativa de los grupos Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA con respecto a los grupos Normal y 0.1 % Ca-DMSA ($p < 0.05$).

La eliminación en orina del metabolito hematopoyético ALA fue el siguiente: en el grupo Normal se encontró una media de ALA-U de 2.7 ± 0.6 mg/l y en el grupo 0.1 % Ca-DMSA la eliminación fue de 2.6 ± 0.6 mg/l sin presentar alguna diferencia significativa entre ambas ($p > 0.05$). En el grupo Pb-Sin DMSA la eliminación de ALA fue de 126 ± 0.9 mg/l y en el grupo tratado con el quelante, Pb-DMSA se redujo la eliminación hasta 35.7 ± 0.9 mg/l con una diferencia significativa entre estos dos grupos ($p < 0.05$). Asimismo, al realizar las comparaciones entre los grupos se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) de los grupos Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA con respecto a los grupos Normal y 0.1 % Ca-DMSA ($p < 0.05$).

Después de los 5 días de tratamiento con DMSA los animales se sacrificaron y se obtuvo sangre para la determinación de algunos marcadores de daño biológico como son: Pb-S, PPF-IX, Hb y Hto. En la Tabla No. 3, podemos observar las concentraciones de estos marcadores (media \pm desviación estándar). Observamos que en el grupo Normal, la concentración de Pb-S alcanzó un nivel de 2.6 ± 0.9 $\mu\text{g/dl}$ sin mostrar alguna diferencia

significativa ($p > 0.05$) con el grupo 0.1 % Ca-DMSA ($3.1 \pm 0.9 \mu\text{g/dl}$); hubo un aumento muy marcado en el grupo Pb-Sin DMSA de $294 \pm 1.6 \mu\text{g/dl}$ pero ocurrió una reducción en el grupo que recibió el quelante, Pb-DMSA de $143 \pm 1.4 \mu\text{g/dl}$. Al realizar las comparaciones respectivas, el grupo Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA presentaron una diferencia significativa $p < 0.05$ y al comparar cada uno de estos grupos con el Normal y el de 0.1 % Ca-DMSA se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

El grupo Pb-Sin DMSA presentó niveles de PPF-IX de $230 \pm 5.5 \mu\text{g/dl}$ mayores que el grupo Pb-DMSA ($81.6 \pm 5.7 \mu\text{g/dl}$) con una diferencia significativa ($p < 0.05$), y al compararlos cada uno contra el grupo Normal ($22 \pm 6.6 \mu\text{g/dl}$) y el grupo 0.1 % Ca-DMSA ($29.7 \pm 6.8 \mu\text{g/dl}$) fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$). No se observó alguna variación significativa entre el Normal y el de 0.1 % Ca-DMSA.

El Pb provocó anemia de grado variable. La concentración de Hb en el grupo Normal fue de $14 \pm 0.9 \text{g/dl}$ y en el grupo 0.1 % Ca-DMSA fue de $14.1 \pm 0.8 \text{g/dl}$ sin presentar alguna diferencia significativa ($p > 0.05$), en el grupo Pb-Sin DMSA se redujo la concentración a $8.4 \pm 1.3 \text{g/dl}$ pero en el grupo Pb-DMSA hubo una recuperación de $11.8 \pm 1.7 \text{g/dl}$. Al realizar las comparaciones respectivas, se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos intoxicados con Pb tratados y no tratados con DMSA así como con el Normal y el de 0.1 % Ca-DMSA.

En esta misma tabla podemos ver que el grupo que recibió la dieta normal presentó niveles de Hto con una media de $46.6 \pm 3.6 \%$ y el grupo 0.1 % Ca-DMSA, de $49.9 \pm 4 \%$ y no hubo entre ellos una variación significativa

($p > 0.05$). El grupo Pb-Sin DMSA ($n = 14$ animales), presentó niveles de Hto de 35.4 ± 4.7 %, en cambio el grupo Pb-DMSA el Hto fue de 42.1 ± 3.5 % siendo diferentes significativamente ($p < 0.05$). Al comparar Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA contra el grupo Normal y 0.1 % Ca-DMSA se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$), con excepción del grupo Pb-DMSA, el cual no presentó alguna variación significativa con respecto al grupo Normal ($p > 0.05$).

5.3 Comparaciones del peso (g) en corazón, bazo, hígado, riñón y fémur

A todos los animales se les realizó la disección de algunos órganos que son afectados comúnmente por el Pb para mostrar los cambios que ocasionó la dieta baja en calcio, ya sea en combinación con el DMSA, con el Pb sólo o Pb y DMSA para compararlo contra la dieta normal. En la Tabla No. 4, se muestra las diferencias del peso en g en corazón, bazo, hígado, riñón y fémur de los grupos del estudio. El grupo Normal y el grupo 0.1 % Ca-DMSA no indican alguna diferencia significativa en ninguno de los órganos así como con los grupos Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA excepto en bazo, en riñón y en fémur. Los grupos intoxicados con Pb con y sin DMSA y que recibieron la dieta baja en calcio observamos que el peso en el bazo fue mayor de 1.5 ± 0.8 g (Pb-Sin DMSA) y 1.1 ± 0.4 g (Pb-DMSA) los cuales no resultaron con diferencias significativas entre ambos pero al compararlos con el Normal (0.6 ± 0.1 g) y el de 0.1 % Ca-DMSA (0.4 ± 0.1 g) sí presentaron una diferencia significativa ($p < 0.05$). En la tabla se observa que el riñón presentó un peso de 2.8 ± 0.8 g en el grupo Pb-Sin DMSA y que el grupo Pb-DMSA su peso fue de 2.4 ± 1 sin que se apreciara alguna diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ambos

grupos, pero al comparar el grupo intoxicado sin el quelante con respecto al grupo 0.1 % Ca-DMSA (1.7 ± 0.2 g) se observó diferencia significativa $p < 0.05$ y no hubo alguna variación con respecto al grupo Normal. Los pesos del fémur fueron de 0.9 ± 0.3 , 0.6 ± 0.1 , 0.4 ± 0.2 y 0.3 ± 0.1 g para los grupos Normal, 0.1 % Ca-DMSA, Pb-Sin DMSA ($n = 15$ animales) y Pb-DMSA ($n = 15$ animales), respectivamente en donde hubo una diferencia significativa ($p < 0.05$) de los grupos Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA con respecto al grupo Normal y 0.1 % Ca-DMSA pero no entre ambos. En este caso se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis a diferencia con las otras variables en donde se utilizó la prueba de ANOVA de una vía.

5.4 Efecto del DMSA en la movilización de Pb tisular

En la Tabla No. 5, observamos la influencia del DMSA en la movilización de Pb a nivel tisular en $\mu\text{g/g}$ de tejido en los animales intoxicados con Pb y mantenidos con dieta 0.1 % Ca. La concentración de Pb en tejido cardíaco en el grupo normal fue de 0.011 ± 0.002 $\mu\text{g/g}$ y en el grupo 0.1 % Ca-DMSA la concentración fue de 0.011 ± 0.003 $\mu\text{g/g}$ sin que presentaran alguna diferencia significativa entre ambas. El grupo Pb-Sin DMSA presentó una concentración de 0.024 ± 0.003 de Pb en $\mu\text{g/g}$ de tejido y al compararlo con el grupo intoxicado que recibió el quelante, Pb-DMSA, podemos observar el efecto de este en la reducción del metal en 0.016 ± 0.003 $\mu\text{g/g}$, en donde se observó una diferencia significativa entre el tratado y no tratado con el DMSA ($p < 0.05$), además, son diferentes significativamente con respecto al grupo Normal y al de 0.1 % Ca-DMSA ($p > 0.05$).

Las concentraciones de Pb en tejido esplénico en el grupo Normal y el grupo 0.1 % Ca-DMSA tuvieron una media de 0.03 ± 0.02 y 0.03 ± 0.01 $\mu\text{g/g}$, respectivamente, sin que se apreciara ninguna diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellos. En cambio, la concentración de Pb en bazo del grupo Pb-Sin DMSA tuvo una media de 0.26 ± 0.02 $\mu\text{g/g}$ reduciéndose en el grupo Pb-DMSA a 0.19 ± 0.03 $\mu\text{g/g}$ siendo diferentes significativamente ($p < 0.05$). Al compararlos contra el grupo Normal y el de 0.1 % Ca-DMSA resultaron ser diferentes significativamente ($p < 0.05$).

El Pb en tejido hepático, se observa en la Tabla No. 5 donde son mínimas las concentraciones en el grupo Normal (0.02 ± 0.01 $\mu\text{g/g}$) y en el grupo 0.1 % Ca-DMSA (0.02 ± 0.01 $\mu\text{g/g}$) sin mostrar alguna diferencia significativa ($p > 0.05$). Se presentó un incremento de la concentración del metal en el grupo Pb-Sin DMSA (0.11 ± 0.01 $\mu\text{g/g}$) pero este disminuyó en el grupo que recibió el quelante, Pb-DMSA (0.06 ± 0.01 $\mu\text{g/g}$) mostrando una diferencia significativa $p < 0.05$, y también fueron diferentes significativamente con respecto al Normal y al de 0.1 % Ca-DMSA.

En riñón, podemos apreciar las altas concentraciones de Pb en el grupo intoxicado Pb-Sin DMSA de 35.81 ± 0.02 $\mu\text{g/g}$ de tejido renal comparado con el grupo Normal (0.07 ± 0.03 $\mu\text{g/g}$) y el de 0.1 % Ca-DMSA (0.08 ± 0.02 $\mu\text{g/g}$) pero se apreció una reducción de la concentración de Pb en el grupo Pb-DMSA (21.92 ± 0.03 $\mu\text{g/g}$). Entre el Normal y el de 0.1 % Ca-DMSA no se observó alguna diferencia significativa ($p > 0.05$), pero entre Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA sí se observó diferencia significativa ($p < 0.05$), asimismo con respecto al Normal y al 0.1 % Ca-DMSA.

Tanto para el grupo Normal como para el de 0.1 % Ca-DMSA, la concentración de Pb fue de $0.03 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$ de tejido óseo sin presentar diferencia significativa ($p > 0.05$). La concentración del metal en Pb-Sin DMSA fue de $5.23 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ ($n = 15$) y en Pb-DMSA la concentración fue de $2.35 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ ($n = 15$), siendo diferentes significativamente ($p < 0.05$), además, mostraron diferencia muy significativa con respecto al grupo Normal y al de 0.1 % Ca-DMSA.

En la Fig. 4, observamos la curva de crecimiento de las ratas Sprague-Dawley graficando el peso en g contra las semanas de estudio (4 etapas: adaptación, intoxicación, pausa y tratamiento) en los distintos grupos. El peso inicial de las ratas en los grupos tratados fue similar (60-70 g) y no mostraron diferencia significativa al inicio del experimento. Al término del estudio, los valores promedio del peso corporal fueron de 294 ± 54 , 195 ± 56 , 138 ± 53 y 158 ± 66 g para los grupos Normal, 0.1 % Ca-DMSA, Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA, respectivamente. Sin embargo, aún cuando el peso fue más bajo en el grupo Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA como se aprecia en la figura no hubo una diferencia significativa entre ambos ($p > 0.05$).

La Fig. 5, muestra los cambios en la eliminación de Pb en orina en $\mu\text{g/l}$ graficado contra el tiempo en días, antes (pausa: 5 días) y durante la terapia con el agente quelante en dosis de 30 mg/Kg/día durante 5 días administrado por vía oral en animales que fueron intoxicados con el Pb y mantenidos con la dieta de 0.1 % Ca comparado con los animales que no recibieron el tratamiento, presentando diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0.05$). Las concentraciones fueron de 950 ± 37 y $4275 \pm 36 \mu\text{g/l}$ para el grupo Pb-Sin DMSA y Pb-DMSA, respectivamente.

El efecto del DMSA en dosis de 30 mg/Kg/día durante 5 días por vía oral en la eliminación de ALA urinario se puede apreciar en la Fig. 6, en donde observamos que la excreción de este metabolito en mg/l en 5 días (pausa) antes del tratamiento con el quelante fue muy alto (126 ± 0.9 mg/l) en los animales que recibieron Pb pero este disminuyó durante el tratamiento con el DMSA hasta 35.7 ± 0.9 mg/l, pudiéndose apreciar una diferencia significativa con respecto al grupo que no recibió el quelante ($p < 0.05$).

En la Fig. 7, se aprecia el cambio provocado por efecto del DMSA en la concentración del metal en sangre en $\mu\text{g/dl}$ (Pb-S) en los animales intoxicados con el Pb y mantenidos con la dieta baja en calcio de 0.1 % (Pb-DMSA) observando una media de 294 ± 1.6 $\mu\text{g/dl}$, presentando una variación significativa ($p < 0.05$) con respecto al que no recibió el quelante, Pb-Sin DMSA (143 ± 1.4 $\mu\text{g/dl}$). En esta gráfica se observa la concentración en $\mu\text{g/dl}$ del metal en los distintos grupos del estudio y en el grupo Normal y 0.1 % Ca-DMSA no apreciando grandes concentraciones de este metal.

La Fig. 8, nos da la estimación de la concentración de PPF-IX en μg por cada 100 ml de sangre en los distintos grupos tratados y no tratados con el DMSA en la dosis de 30 mg/Kg/día durante 5 días por vía oral. Fácilmente se aprecia la alta concentración de la PPF-IX en el grupo Pb-Sin DMSA (230 ± 5.5 $\mu\text{g/dl}$) y al compararlo contra el grupo que recibió el quelante, Pb-DMSA (81.6 ± 5.7 $\mu\text{g/dl}$) se observó una diferencia significativa de $p < 0.05$. No se observó diferencia significativa entre el grupo Normal y el de 0.1 % Ca-DMSA.

La Fig. 9, muestra los niveles de Hb en g/dl en los grupos estudiados, observándose cambios en la concentración en el grupo intoxicado con Pb y los

demás grupos. La concentración en el grupo Normal y de 0.1 % Ca-DMSA son similares, pero esta se ve reducida en el grupo Pb-Sin DMSA (8.4 ± 1.3 g/dl) observándose una recuperación en el grupo Pb-DMSA (11.8 ± 1.7 g/dl), con una diferencia significativa $p < 0.05$.

En la Fig. 10, se graficaron los niveles de Hto en % expresados como la media \pm una desviación estándar en los diferentes grupos. En este gráfica se observa el efecto del DMSA administrado por vía oral en dosis de 30 mg/Kg/día durante 5 días en la concentración del Hto de los animales intoxicados con Pb y mantenidos con la dieta de 0.1 % Ca (Pb-DMSA) los cuales mostraron una media de 42.1 ± 3.5 % con el tratamiento siendo cercano sus valores al grupo Normal. Se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al grupo Pb-Sin DMSA (35.4 ± 4.7 %).

En la Fig. 11, observamos la influencia del DMSA administrado por vía oral en dosis de 30 mg/Kg/día durante 5 días en la concentración de Pb en tejido cardíaco ($\mu\text{g/g}$ del tejido) en animales intoxicados con Pb y mantenidos con la dieta 0.1 % Ca. En esta figura, se observa la reducción de la carga corporal del metal en el grupo Pb-DMSA (0.016 ± 0.003 $\mu\text{g/g}$) comparado con el grupo Pb-Sin DMSA (0.024 ± 0.003 $\mu\text{g/g}$) mostrando una diferencia significativa $p < 0.05$ entre ambos y cada uno contra el Normal y el de 0.1 % Ca-DMSA.

El efecto del DMSA en la concentración de Pb en tejido esplénico podemos apreciarlo en la Fig. 12, en donde se graficó la concentración del metal en $\mu\text{g/g}$ del tejido (media \pm desviación estándar). La administración del quelante en dosis de 30 mg/Kg/día durante 5 días, ocasionó una reducción en

la concentración de este metal en el grupo Pb-DMSA indicado con un valor medio de $0.19 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ comparado contra el grupo que no recibió el quelante, Pb-Sin DMSA ($0.26 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$) mostrando una diferencia significativa $p < 0.05$.

La movilización de la carga corporal de Pb en tejido hepático debido al efecto del DMSA se observa en la Fig. 13, en donde la concentración del metal en $\mu\text{g/g}$ de tejido en los animales mantenidos con la dieta de 0.1 % Ca e intoxicados con Pb, disminuyó durante los 5 días que recibió la administración oral del quelante en dosis de 30 mg/Kg/día en el grupo Pb-DMSA ($0.06 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$) comparado contra el grupo Pb-Sin DMSA ($0.11 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$) ($p < 0.05$). En el grupo Normal y de 0.1 % Ca-DMSA las concentraciones son similares entre sí y diferentes de los grupos intoxicados.

La Fig. 14, demuestra el efecto de la administración de DMSA en la concentración de Pb en tejido renal graficado en $\mu\text{g/g}$ del tejido en los grupos tratados y no tratados con el quelante. El grupo Pb-Sin DMSA presentó una concentración del metal de $35.81 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ y el grupo Pb-DMSA muestra una reducción de la carga de $21.92 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ con una variación significativa $p < 0.05$. La concentración de Pb en los grupos Normal y 0.1 % Ca-DMSA fueron muy pequeñas las cuales no se aprecian en la gráfica.

En la Fig. 15, la estimación del efecto del DMSA en la movilización de Pb se aprecia en tejido óseo (fémur), en donde los animales intoxicados con Pb manifiestan una concentración de $5.23 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ el cual se redujo hasta $2.35 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$, siendo significativamente diferentes. La media \pm desviación estándar del grupo Normal y 0.1 % Ca-DMSA no se aprecia en la gráfica.

TABLA No. 1

PARAMETROS BIOLOGICOS MONITOREADOS DURANTE LA SEMANA DE TRATAMIENTO CON EL DMSA EN LOS DIFERENTES GRUPOS.

DIETA	1 % Ca		0.1 % Ca	
	Normal n = 7	DMSA n = 7	Pb-Sin DMSA n = 19	Pb-DMSA n = 20
GRUPO PARAMETROS				
SOBREVIVENCIA (%)	100	100	95	100
PESO (g)	294 ± 54	194 ± 56 ^a	138 ± 53 ^a	158 ± 66 ^a
VOLUMEN URINARIO (ml)	13.9 ± 2.9	5.8 ± 1.4	22.1 ± 7.1	27.5 ± 9.7
pH URINARIO	7.5 ± 0.3	5.9 ± 0.2	6.2 ± 0.2	6 ± 0.2
PROTEINAS-U	3 (tr)	3 (+)	7 (tr)	10 (tr)
HEMOGLOBINA-U	2 (+)	1 (+)	7 (tr); 3 (+)	10 (tr); 2 (+)
CETONICOS-U	4 (+)	0	8 (tr)	8 (tr)
BILIRRUBINA-U	0	0	6 (tr); 2 (+)	3 (tr); 6 (+)

Datos: Media ± D. E. a (p < 0.05) comparado con el grupo Normal. Número de animales con niveles detectables de algunas sustancias determinadas en la tira reactiva indicados por trazas (tr) y por una +. Proteína: tr (15 mg/dl), + (30 mg/dl); cetona: tr (5 mg/dl), + (10 mg/dl); hemoglobina: 0.015-0.062 mg/l y bilirrubina: tr (0.4 mg/dl), + (0.8 mg/dl).

TABLA No. 2

EFEECTO DEL DMSA (30 mg/Kg/día/5 días, vía oral) EN INDICADORES DE DAÑO BIOLÓGICO A NIVEL URINARIO EN ANIMALES INTOXICADOS CON Pb Y ALIMENTADOS CON UNA DIETA 0.1 % DE CALCIO.

DIETA	0.1 % Ca			
	1 % Ca	DMSA	Pb-Sin DMSA	
GRUPO VARIABLE	Normal n = 7	DMSA n = 7	Pb-DMSA n = 20	
	Pb-U (µg/l)	95.6 ± 31.2	90 ± 28.3	950 ± 37 ^{a,b,c}
ALA-U (mg/l)	2.7 ± 0.6	2.6 ± 0.6	126 ± 0.9 ^{a,b,c}	4275 ± 36 ^{a,b}

Datos: Media ± D. E. No existe diferencia significativa entre el Normal y el de 0.1 %Ca-DMSA. a (p < 0.05) comparado con el grupo Normal; b (p < 0.05) con respecto al grupo 0.1 % Ca-DMSA; c (p < 0.05) con respecto al grupo Pb-DMSA.

TABLA No. 3

EFECTO DEL DMSA (30 mg/Kg/día/5 días, vía oral) EN INDICADORES DE DAÑO BIOLÓGICO EN SANGRE EN ANIMALES INTOXICADOS CON Pb Y ALIMENTADOS CON UNA DIETA 0.1 % DE CALCIO.

DIETA	0.1 % Ca			
	1 % Ca	DMSA	Pb-Sin DMSA	Pb-DMSA
GRUPO VARIABLE	Normal n = 7	n = 7	n = 19	n = 20
Pb-S (µg/dl)	2.6 ± 0.9	3.1 ± 0.9	294 ± 1.6 ^{a,b,c}	143 ± 1.4 ^{a,b}
PPF-IX (µg/dl)	22 ± 6.6	29.7 ± 6.8	230 ± 5.5 ^{a,b,c}	81.6 ± 5.7 ^{a,b}
Hb (g/dl)	14 ± 0.9	14.1 ± 0.8	8.4 ± 1.3 ^{a,b,c}	11.8 ± 1.7 ^{a,b}
Hto (%)	46.6 ± 3.6	49.9 ± 4	*35.4 ± 4.7 ^{a,b,c}	42.1 ± 3.5 ^a

Datos: Media ± D. E. * n = 14. No existe diferencia significativa entre el Normal y el de 0.1 % Ca-DMSA. a (p < 0.05) comparado con el grupo Normal; b (p < 0.05) con respecto al grupo 0.1 % Ca-DMSA; c (p < 0.05) con respecto al grupo Pb-DMSA.

TABLA No. 4

PESO EN GRAMO DE LOS ORGANOS: CORAZON, BAZO, HIGADO, RIÑON Y FEMUR DE LOS DIFERENTES GRUPOS.

DIETA	1 % Ca			0.1 % Ca		
	Normal n = 7	DMSA n = 7	Pb-Sin DMSA n = 19	Pb-DMSA n = 20		
CORAZON	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2		
BAZO	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.5 ± 0.8 ^{a,b}	1.1 ± 0.4 ^{a,b}		
HIGADO	10.2 ± 2	10.4 ± 1.3	8.8 ± 2	9.2 ± 1.6		
RIÑON	2 ± 0.4	1.7 ± 0.2	2.8 ± 0.8 ^b	2.4 ± 1		
FEMUR	0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.1	* 0.4 ± 0.2 ^{a,b}	* 0.3 ± 0.1 ^{a,b}		

Datos: Media ± D. E. * n = 15. No existe diferencia significativa entre el Normal y el de 0.1 % Ca-DMSA. a (p < 0.05) comparado con el grupo Normal; b (p < 0.05) con respecto al grupo 0.1 % Ca-DMSA.

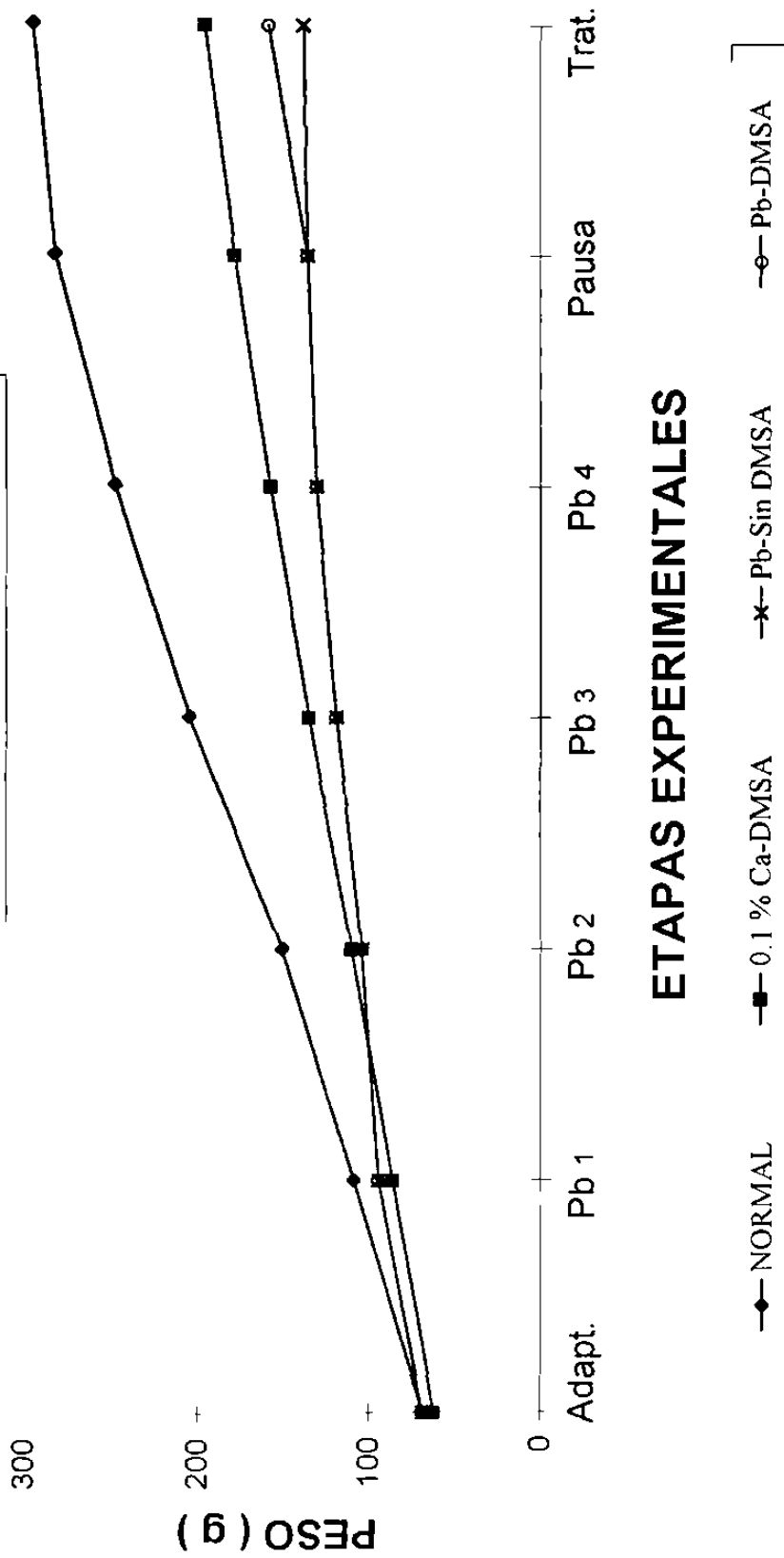
TABLA No. 5

**INFLUENCIA DEL DMSA EN LA MOVILIZACION DE PLOMO A NIVEL TISULAR
(µg/g de tejido) EN RATAS INTOXICADAS CON ESTE METAL Y ALIMENTADAS
CON UNA DIETA 0.1 % DE CALCIO.**

DIETA	0.1 % Ca			
	1 % Ca	DMSA	Pb-Sin DMSA	Pb-DMSA
GRUPO TEJIDOS	Normal n = 7	DMSA n = 7	Pb-Sin DMSA n = 19	Pb-DMSA n = 20
CORAZON	0.011 ± 0.002	0.011 ± 0.003	0.024 ± 0.003 ^{a,b,c}	0.016 ± 0.003 ^{a,b}
BAZO	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.26 ± 0.02 ^{a,b,c}	0.19 ± 0.03 ^{a,b}
HIGADO	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.11 ± 0.01 ^{a,b,c}	0.06 ± 0.01 ^{a,b}
RIÑON	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.02	35.81 ± 0.02 ^{a,b,c}	21.92 ± 0.03 ^{a,b}
FEMUR	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	* 5.23 ± 0.02 ^{a,b,c}	* 2.35 ± 0.02 ^{a,b}

Datos: Media ± D. E. * n = 15. No existe diferencia significativa entre el Normal y el de 0.1 % Ca-DMSA.
a (p < 0.05) comparado con el grupo Normal; b (p < 0.05) con respecto al grupo 0.1 % Ca-DMSA;
c (p < 0.05) con respecto al grupo Pb-DMSA.

CURVA DE CRECIMIENTO RATAS SPRAGUE-DAWLEY



ETAPAS EXPERIMENTALES

Fig. 4 Curva de crecimiento de las ratas Sprague-Dawley durante las 7 semanas de estudio en los distintos grupos. Etapas: adaptación (adapt.; 1 semana), intoxicación con el Pb (4 semanas), pausa (1 semana) y tratamiento con el quelante (trat.; 1 semana).

NIVEL DE PLOMO URINARIO (Pb-U)

Efecto del DMSA

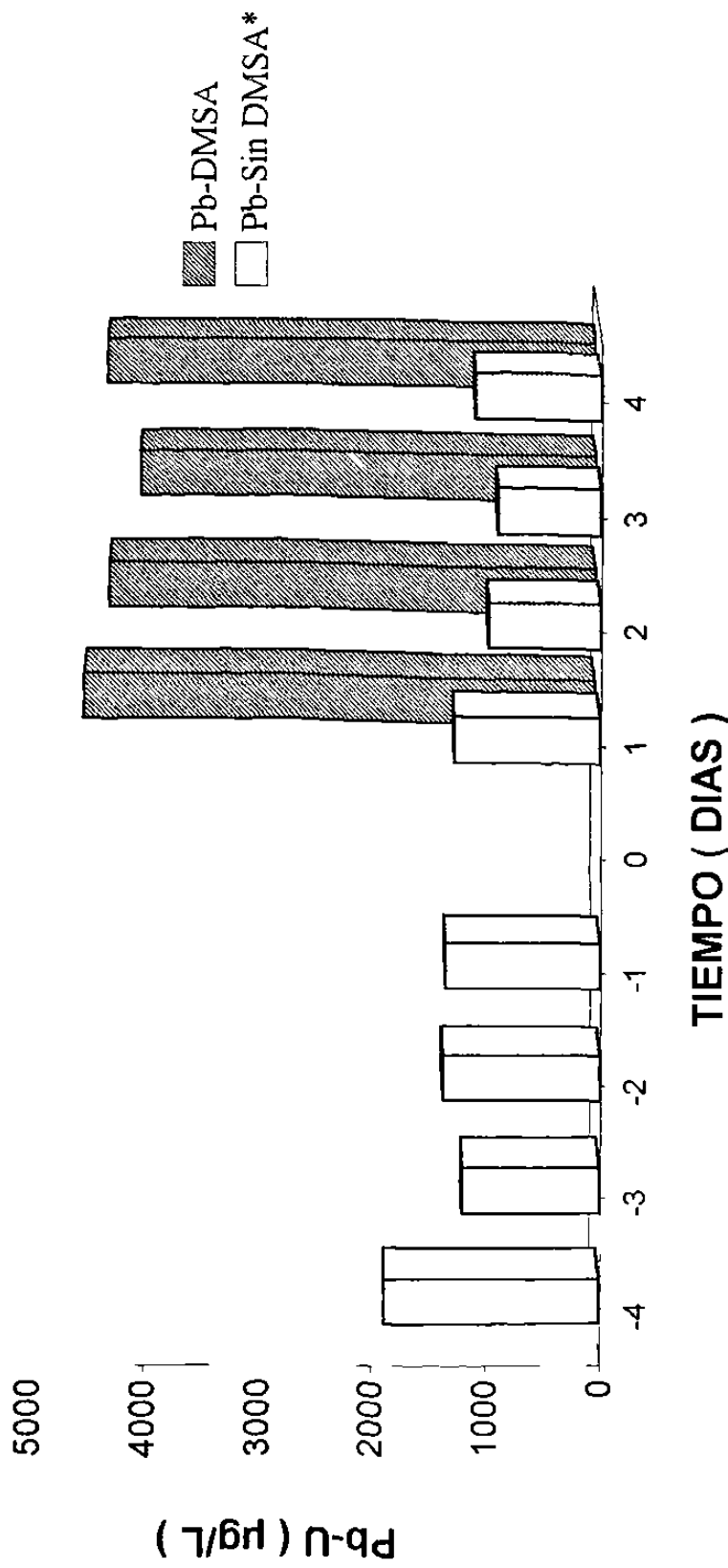


Fig. 5 Cambios en la eliminación de Pb en orina antes y durante la terapia de quelación con DMSA administrado por vía oral (30 mg/Kg/día/5 días) en animales intoxicados con Pb y mantenidos con una dieta baja en calcio. * $p < 0.05$ con respecto al grupo Pb-DMSA.

ACIDO δ -AMINOLEVULINICO URINARIO (ALA-U)

Efecto del DMSA

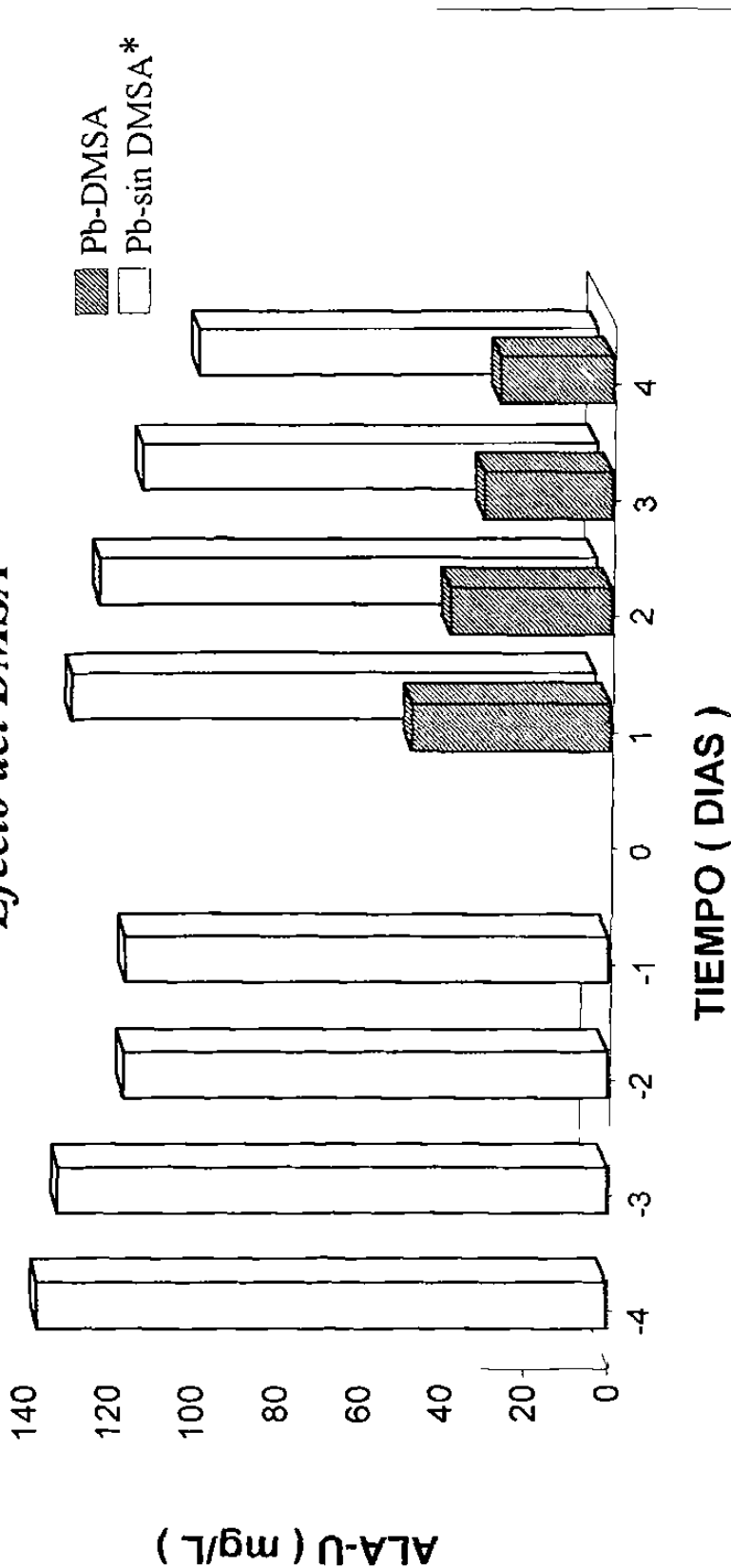


Fig. 6 Excreción urinaria de ALA antes y durante la terapia de quelación con DMSA (30 mg/Kg/día/5 días, vía oral) en los animales intoxicados con Pb y mantenidos con una dieta baja en calcio. * $p < 0.05$ respecto a Pb-DMSA.

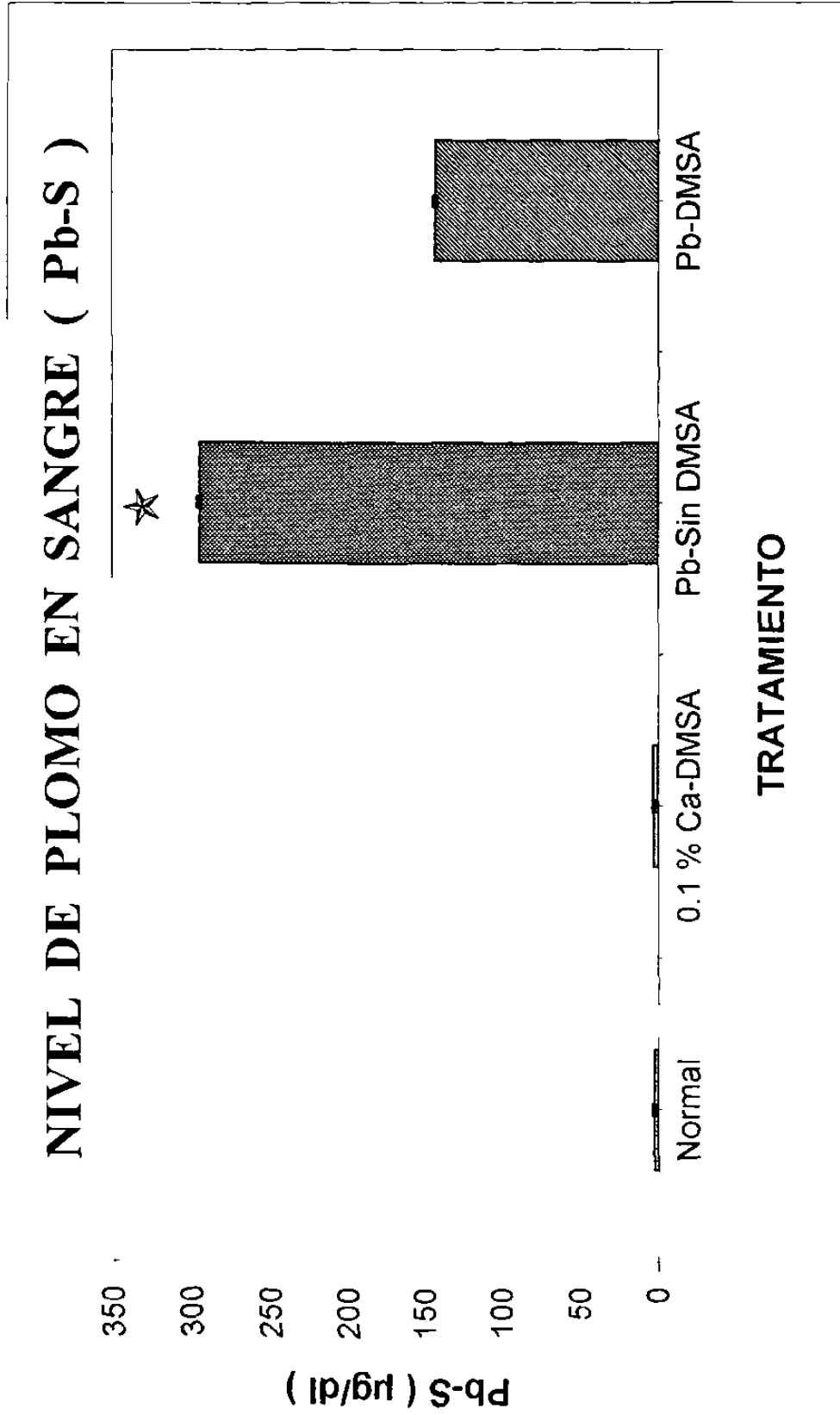


Fig. 7 Cambios en la concentración de Pb en sangre después del tratamiento con DMSA en dosis de 30 mg/Kg/día/5 días administrado por vía oral. Media ± D.E. ★ $p < 0.05$ respecto al grupo Pb-DMSA.

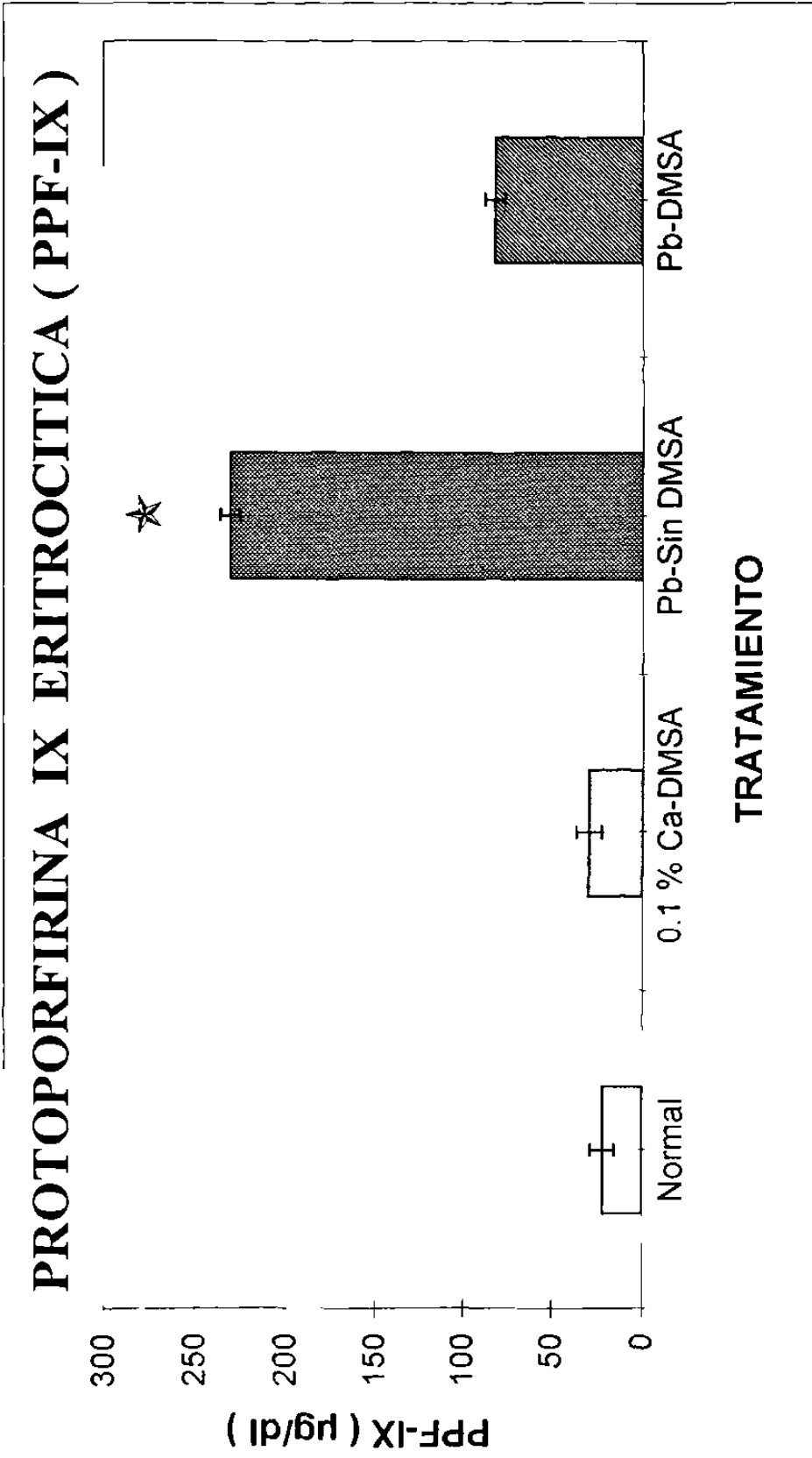


Fig. 8 Estimación de la concentración de PPF-IX en los diferentes grupos tratados y no tratados con DMSA en dosis de 30 mg/Kg/día/5 días por vía oral. Media ± D.E. ★ $p < 0.05$ respecto al grupo Pb-DMSA.

NIVEL DE HEMOGLOBINA (Hb)

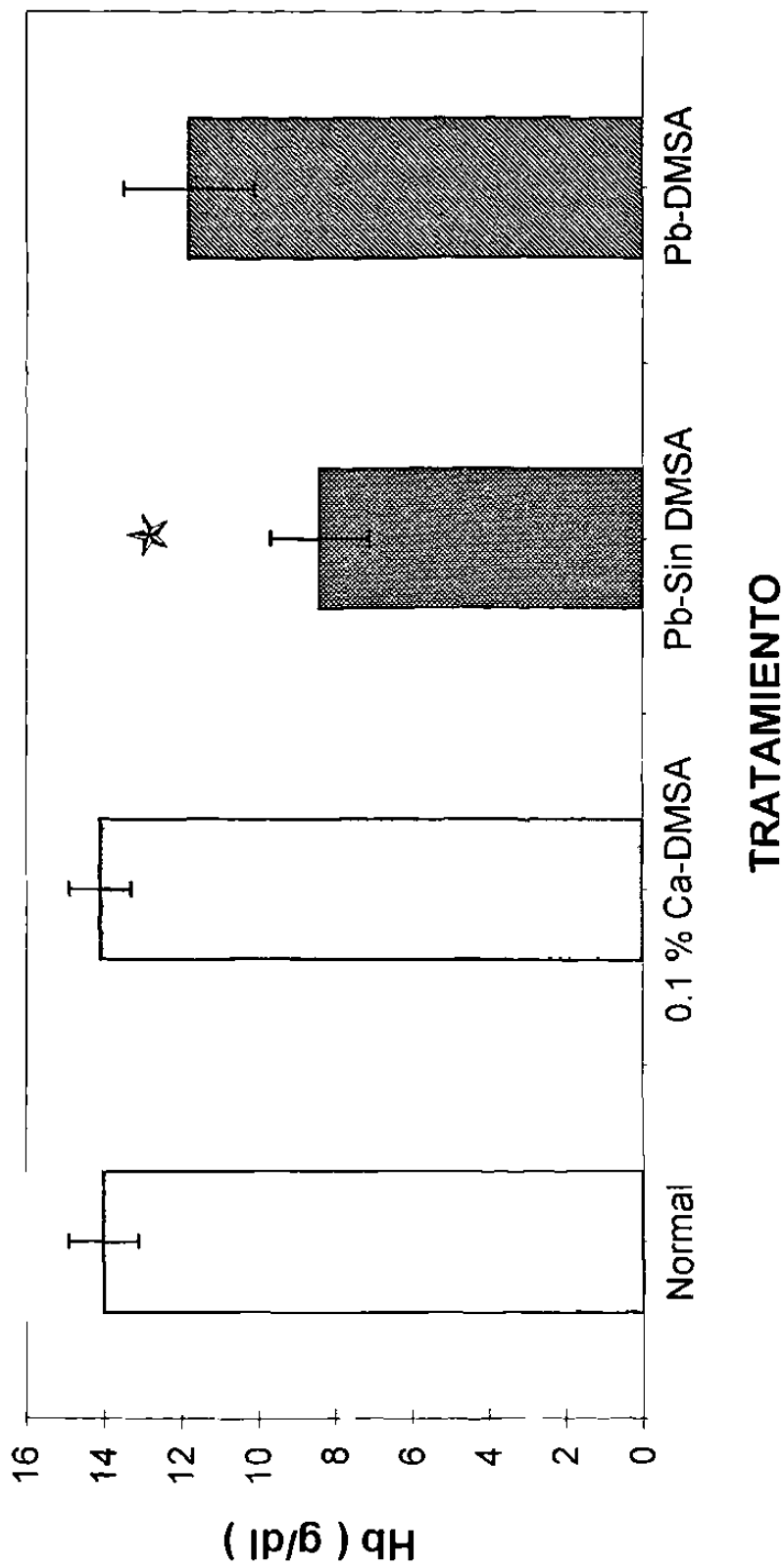
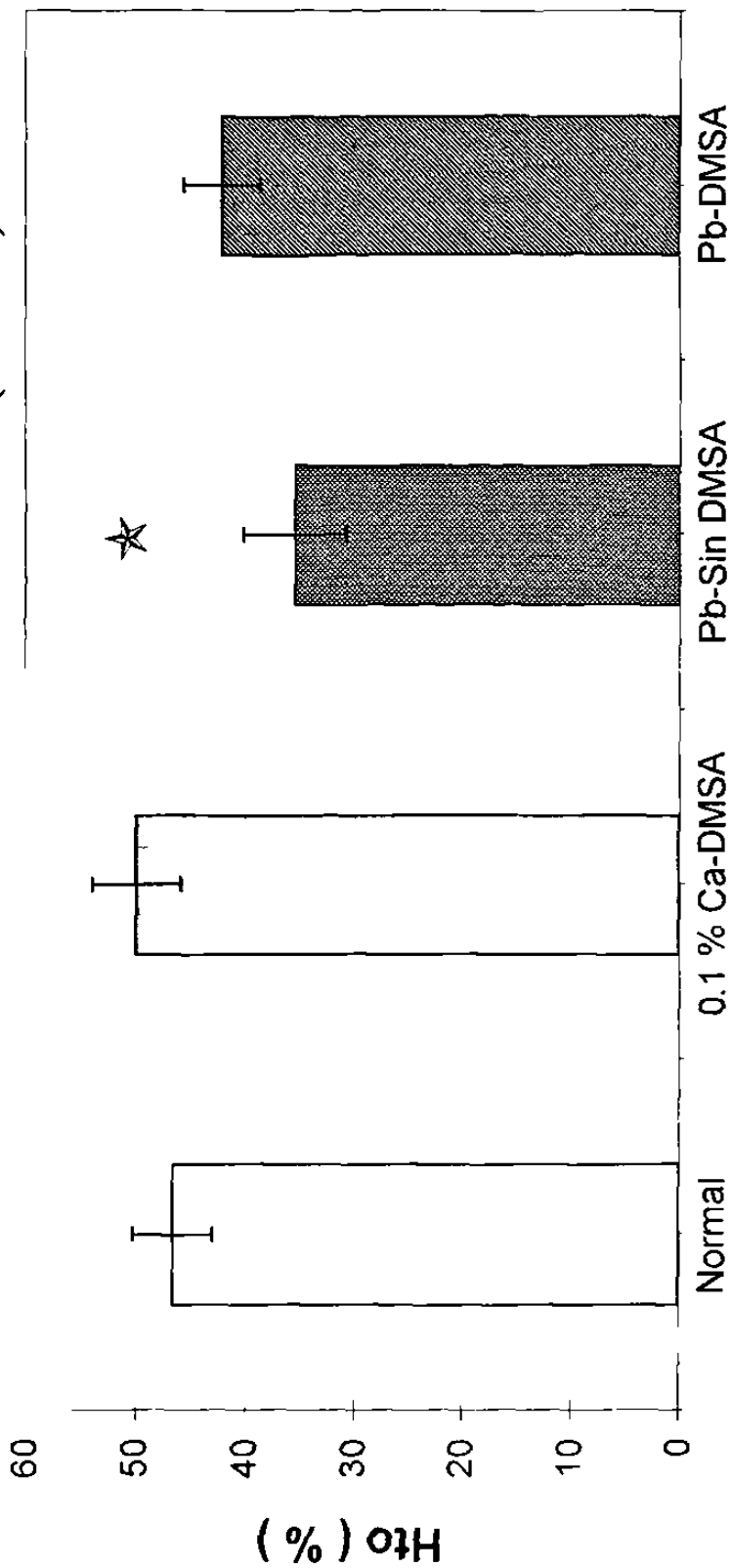


Fig. 9 Cambios en la concentración de Hb como un resultado del tratamiento con DMSA (30 mg/Kg/día/5 días, vía oral) comparado entre los distintos grupos. Media \pm D. E. \star $p < 0.05$ respecto a Pb-DMSA.

NIVEL DE HEMATOCRITO (Hto)



TRATAMIENTO

Fig. 10 Efecto del DMSA (30 mg/Kg/día/5 días, vía oral) en la concentración de Hto comparado entre los distintos grupos tratados y no tratados con el quelante. Media \pm D. E. * $P < 0.05$ respecto al grupo Pb-DMSA.

CONCENTRACION DE PLOMO EN CORAZON

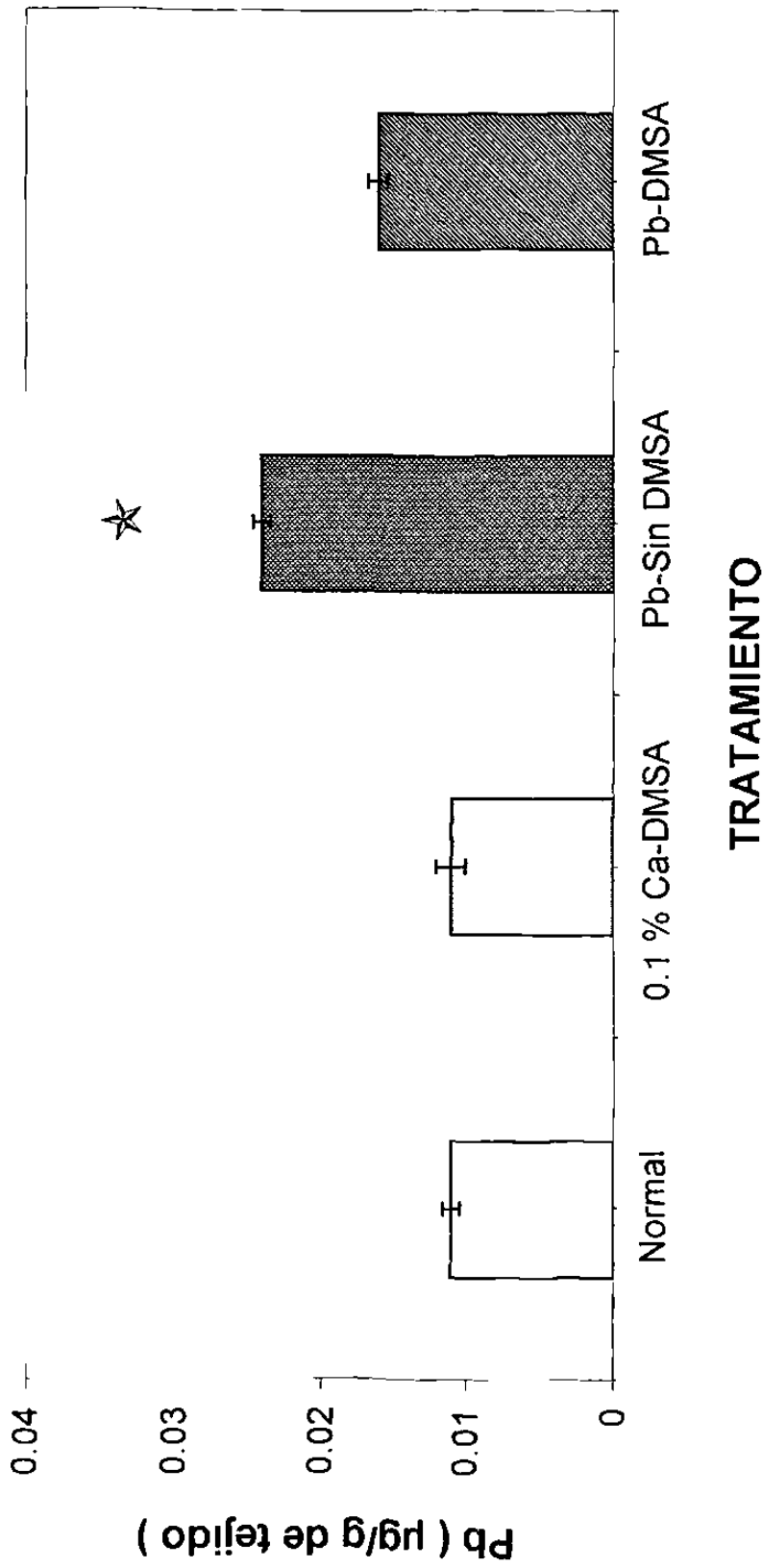


Fig. 11 Influencia del DMSA (30 mg/Kg/día/5 días, vía oral) en la concentración de Pb en corazón en animales mantenidos con una dieta baja en calcio (0.1 % Ca) e intoxicados con Pb. Media \pm D.E. \star $p < 0.05$ respecto al grupo Pb-DMSA.

CONCENTRACION DE PLOMO EN BAZO

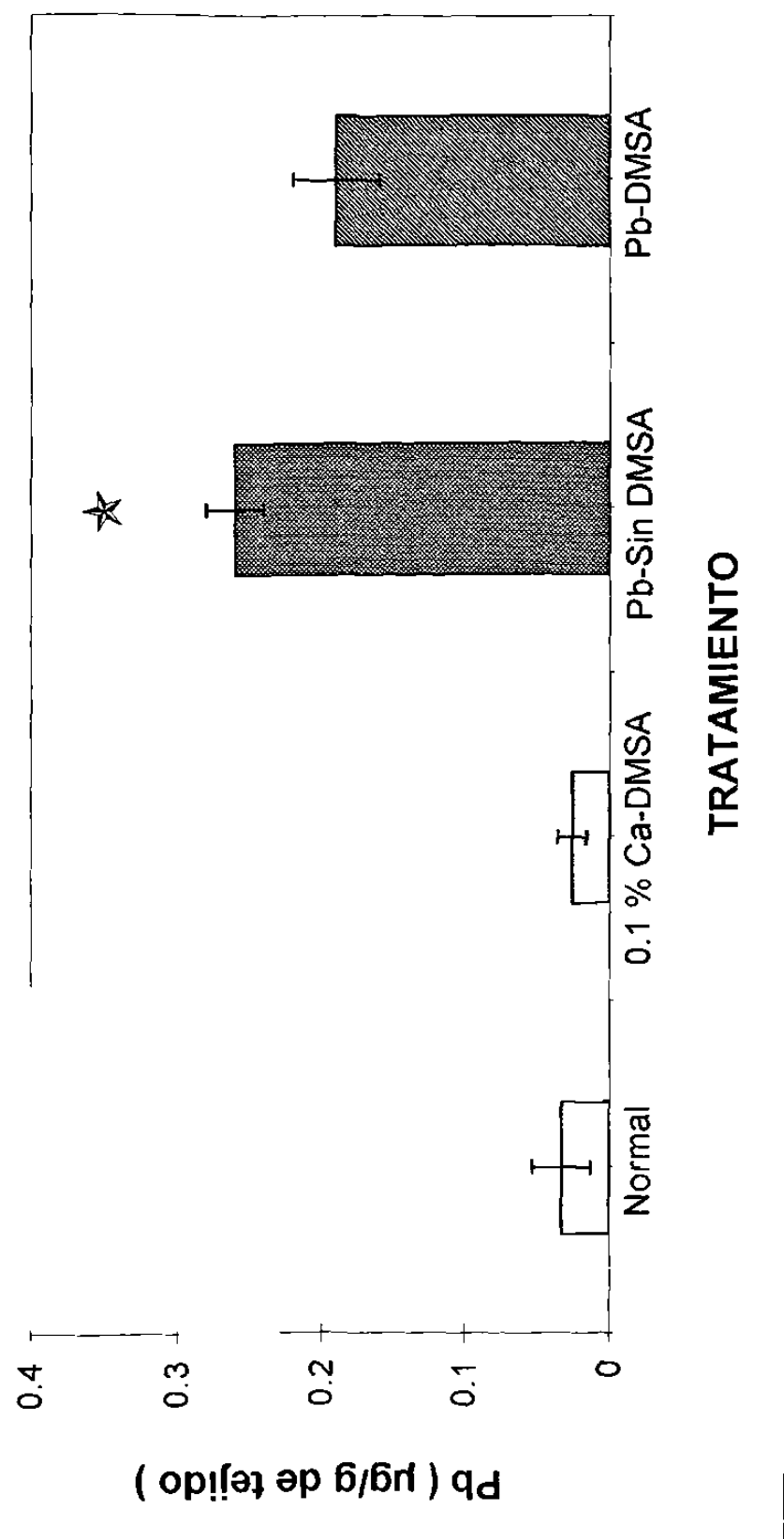


Fig. 12 Efecto del DMSA (30 mg/Kg/día/5 días, vía oral) en la movilización de la carga corporal de Pb en bazo en animales intoxicados con el metal y mantenidos con una dieta baja en calcio (0.1 % Ca). Media \pm D. E. * $p < 0.05$ respecto al grupo Pb-DMSA.

CONCENTRACION DE PLOMO EN HIGADO

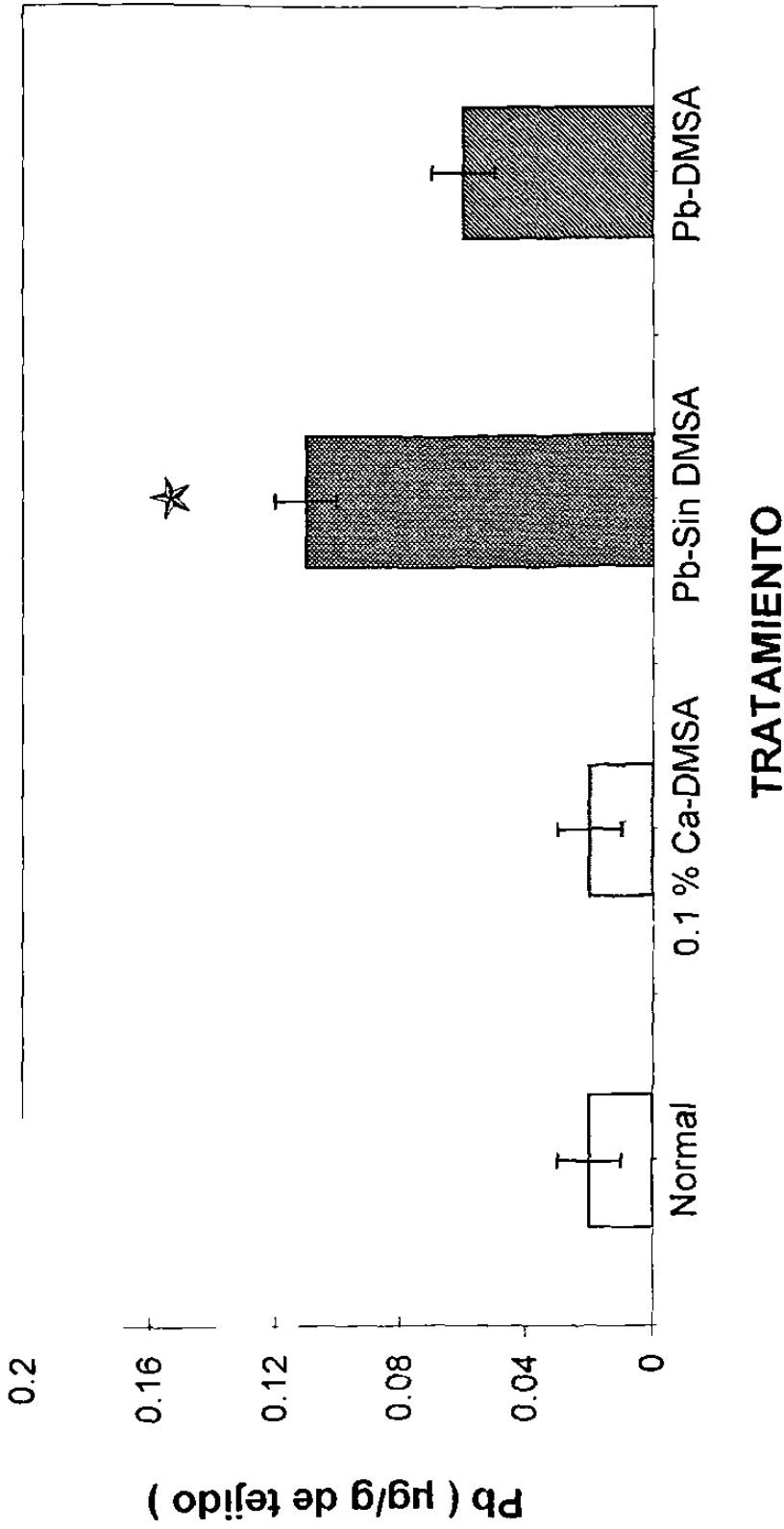


Fig. 13 Movilización de la carga corporal de Pb en hígado por efecto del DMSA (30 mg/Kg/día/ 5 días, vía oral) en animales mantenidos con una dieta baja en calcio (0.1 % Ca) e intoxicados con Pb. Media \pm D.E. * $p < 0.05$ respecto al grupo Pb-DMSA.

CONCENTRACION DE PLOMO EN RIÑÓN

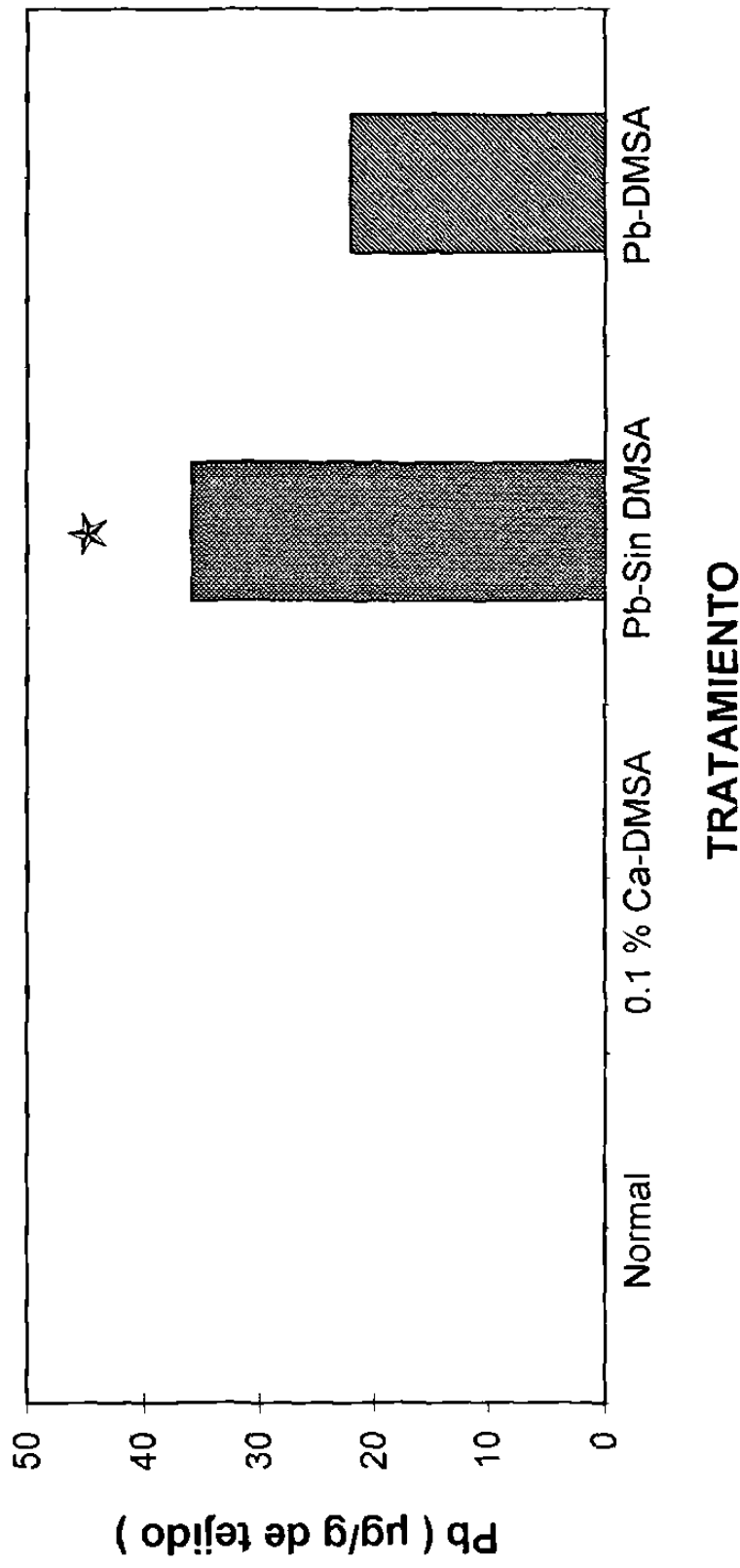


Fig. 14 Efecto de la administración de DMSA en dosis de 30 mg/Kg/día/5 días por vía oral en la reducción de la carga corporal de Pb en riñón de animales mantenidos con una dieta baja en calcio (0.1 % Ca) e intoxicados con Pb. Media \pm D.E. ★ $p < 0.05$ respecto al grupo Pb-DMSA.

CONCENTRACION DE PLOMO EN FEMUR

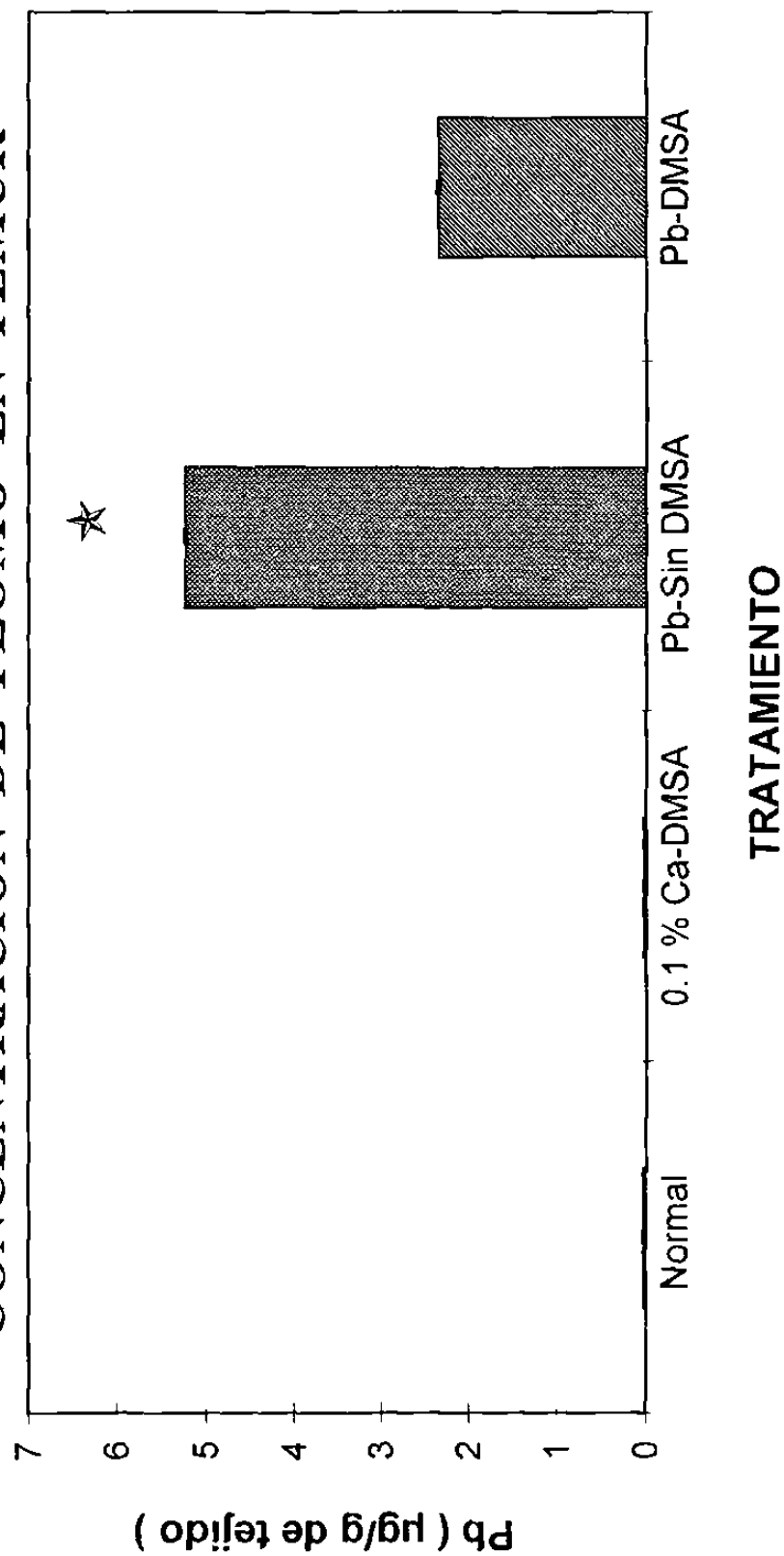


Fig. 15 Efecto del DMSA (30 mg/Kg/día/5 días, vía oral) en la concentración de Pb en hueso en animales mantenidos con una dieta baja en calcio (0.1 % Ca) e intoxicados con Pb. Media \pm D.E. ☆ $p < 0.05$ respecto al grupo Pb-DMSA.

6 DISCUSION

Sabemos que los compuestos de Pb responsables junto con otros elementos de la contaminación ambiental son en su mayor parte de tipo inorgánico y en las zonas urbanas e industriales este metal se puede presentar en concentraciones elevadas y con posibles implicaciones para constituir una amenaza a la salud humana.

Como se mencionó en la introducción, el Pb es un agente tóxico que se acumula progresivamente en el organismo humano, sus efectos tóxicos son diversos y suelen llegar a ser severos si no se atienden adecuadamente.

En un trabajo anterior (González, 1994) se montó un modelo de intoxicación con Pb en animales alimentados con una dieta baja en calcio (0.1 %) y se reportó el efecto del DMSA en esas condiciones en varios parámetros como ALA-U, PPF-IX, Hb, Hto, Pb-S y Pb-U en un pequeño grupo de ratas que después de 4 semanas de la administración de Pb se les dió por una semana el DMSA a la dosis de 30 mg/Kg/día/5 días mostrando una reducción en los niveles del metal en sangre, de ALA-U, y apreciándose además, una recuperación en los niveles de Hb y Hto.

El presente es un estudio que tuvo como objetivo conocer la acumulación de Pb en los tejidos y su posible movilización por el quelante. Se utilizaron animales (ratas Sprague-Dawley) a los cuales se les mantuvo en las mismas condiciones de dieta baja en calcio (0.1 %) como el estudio mencionado e intoxicados con Pb y se les administró DMSA para observar la movilización del

metal tóxico en diversos órganos ocupados por este metal y observar cambios fisiológicos de recuperación en los animales tratados.

La literatura menciona que existen ciertos factores dietéticos que juegan un papel importante en la toxicidad del Pb. Por ejemplo, la deficiencia de calcio en combinación con el Pb puede incrementar los efectos tóxicos de éste (Six y Goyer, 1970) y nuestros resultados experimentales coinciden en que al menos la ingesta de la dieta baja en calcio influyó en los efectos patológicos de exposición a una dosis específica de Pb ocasionando una intoxicación grave por este metal.

En primer lugar, observamos que la dieta baja en calcio combinada con el Pb disminuyó el porcentaje de sobrevivencia en la población estudiada, y esto ocurrió desde el inicio de la etapa de intoxicación con el metal. En la literatura se reporta que una dieta baja en calcio puede ocasionar la muerte en animales jóvenes después de algunas semanas con Pb en la dieta sin que se presentara esta situación con animales adultos (Gerber y Deroo, 1975). Además, la dieta baja en calcio provocó una disminución en el peso corporal en comparación con los animales que recibieron la dieta normal de calcio (1 %), concordando esto con lo dicho por Mahaffey et al., en 1973.

Se observaron variaciones en el valor de pH urinario y pensamos que pueda deberse a la dieta alimenticia a la que fueron mantenidos los animales en las diferentes etapas del estudio. Por otra parte la determinación semicuantitativa de varios indicadores en la orina nos indican un probable daño renal demostrado por la presencia de proteína, sangre, cetona y bilirrubina en un buen número de animales que fueron intoxicados con Pb. Aún cuando el

número de animales fue menor para los grupos Normal y 0.1 % Ca-DMSA, la presencia de proteína, sangre y cetona (en el caso del que recibió la dieta normal) se podría explicar por la influencia de la dieta tanto la normal como la de calcio bajo, y que la presencia de sangre en ambos grupos, podría deberse a un daño renal o a un daño físico espontáneo, sin quedar exentos en esto los animales que recibieron el Pb.

La preparación del DMSA consistió en disolverlo en un pequeño volumen de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 0.5 M y aforarlo con H_2O desionizada ajustando el pH a 7.5 y es importante señalar que previamente se realizaron varias pruebas de disolución del quelante administrándose a pequeños grupos de animales. Primero se disolvió únicamente en H_2O desionizada ajustándose a un pH ácido pero esto no aseguraba que el quelante se encontraba completamente disuelto. Varios autores indican disolver el quelante en una solución de NaHCO_3 0.5 M y aforarlo en esta solución ajustando el pH a 8.5, pero observamos ciertos cambios en estos animales con deficiencia en calcio ocasionando una diuresis muy marcada con la consecuente mortalidad en los animales tanto los que recibían únicamente dieta baja en calcio como los intoxicados. Por ello hicimos algunas pruebas de disolución del quelante con pequeños volúmenes de NaHCO_3 0.5 M y elegimos la de pH de 7.5 porque no se vió que afectara a los animales.

Ya algunos autores han señalado que la dieta deficiente en calcio en combinación con el Pb puede provocar una mayor alteración de algunos indicadores de daño por este metal inhibiendo una enzima de la síntesis del hemo: la deshidratasa del ácido delta aminolevulínico (ALA-D) produciendo como consecuencia una acumulación de su sustrato, el ácido δ -aminolevulínico

(ALA). Se apreció un incremento muy marcado en la eliminación de ALA en orina considerándolo uno de los mejores indicadores de daño biológico en la intoxicación por Pb y es importante mencionar que la excreción de este metabolito disminuyó considerablemente por efecto del DMSA en los animales que se mantuvieron con una dieta baja en calcio en combinación con Pb en comparación con el grupo no tratado con el quelante a causa de la remoción de Pb del grupo -SH de la enzima.

Clínicamente, la medición de Pb a nivel urinario continúa siendo una de las variables más comunes para la detección de una intoxicación por el Pb, además, observamos la efectividad del quelante DMSA al incrementar su eliminación del organismo, lo cual es uno de los propósitos al usar agentes quelantes. Observamos cómo la eliminación del metal se incrementó más del doble durante la semana de tratamiento con el DMSA en la dosis usada en comparación con el grupo intoxicado con Pb y que no recibió el quelante. Es necesario hacer patente que las concentraciones de Pb presentes en la orina de los animales que no fueron intoxicados con el Pb no son bajas tomando en cuenta que no recibían este metal, esto pudiera ser por varias razones: que pudiera provenir de la dieta, del ambiente, del agua bebida y/o del bioterio de donde se entregaron al terminar el tiempo de destete de estos animales, sin embargo, estos valores son mucho menores que en los grupos intoxicados.

La gran cantidad de Pb presente en los eritrocitos en comparación con el plasma hace que estos actúen como un mecanismo de transporte del metal en la sangre para su posterior distribución en varios órganos (Conrad y Barton, 1978). En el estudio se apreció un incremento muy grande en la concentración de Pb-S de más del 100 % en los animales que fueron intoxicados y

mantenidos con la dieta de 0.1 % Ca comparado con el grupo que recibió la dieta baja en calcio y DMSA, corroborando esto lo mencionado en nuestro protocolo de provocar una intoxicación grave por Pb en esas condiciones de alimentación. En el grupo intoxicado al recibir la administración del quelante disminuyó la concentración de Pb en sangre muy significativamente hasta un 50 % aproximadamente, demostrando con ello la eficacia del DMSA. La disminución de Pb-S revirtió el bloqueo de ALA-D en la vía de síntesis del hemo y consecuentemente la disminución de ALA-U.

Otro indicador de daño de una intoxicación por Pb, son los niveles de PPF-IX eritrocítica, en donde se apreció el incremento marcado en los niveles de este metabolito en el grupo intoxicado con el Pb en combinación con la dieta deficiente en calcio comparado con los animales no intoxicados, coincidiendo con lo reportado en que una inhibición de la ferroquelatasa impide que se incorpore hierro en la molécula de protoporfirina sin que se pueda formar el grupo hemo y acumulándose este metabolito. Al recibir el agente quelante se presentó una reducción en la concentración de PPF suponiendo que el DMSA libera a la ferroquelatasa y disminuye la presencia de la protoporfirina sin hierro.

Los cambios patológicos provocados por el Pb y agravados por la dieta baja en calcio suelen ser, además de la excreción incrementada de ALA-U, las anemias (Levander, 1979). Nuestros datos muestran el grado de anemia consistente con la intoxicación severa provocada por el Pb en combinación con la dieta baja en calcio demostrado por los niveles de Hb y Hto reducidos (González, 1994), pero la administración del agente quelante llevó a una

recuperación rápida cercana a los valores reportados dentro de lo normal a pesar de que su administración fue por sólo 5 días.

El Pb al ser distribuido en la sangre, parcialmente se deposita de una manera reversible en riñón, hígado y otros tejidos, depositándose finalmente en hueso redistribuyéndose a los sitios metabólicamente más activos como el fémur (Goldfrank et al., 1990).

Varios autores señalan que puede haber un aumento en el tamaño del riñón por efecto de la combinación de Pb y la dieta baja en calcio entre algunas otras alteraciones patológicas (p. ej. Barton et al., 1978); en este estudio, confirmamos que el peso total del riñón se incrementó en los animales que recibieron la dieta 0.1 % Ca y Pb. Lo mismo observamos con el peso del bazo. Es de suponer que la disminución observada en el peso del fémur en los animales en esas condiciones fue por un efecto de la dieta baja en calcio en el peso y tamaño de los animales sujetos a esa dieta.

Es importante mencionar que la estimación de Pb en los diversos órganos por espectroscopía de absorción atómica se hizo para determinar si ocurrió o no la movilización de este metal por efecto del quelante, y se llevó a cabo haciendo primero una digestión ácida de los órganos en un digestor de microondas a altas presiones, en donde se destruyó toda la materia orgánica presente en la muestra previniéndose la volatilización del metal de interés. Este es un proceso rápido, fácil de controlar y con una buena recuperación del Pb eliminando al mismo tiempo la contaminación externa por ser un sistema cerrado.

Existen algunos reportes sobre la influencia del DMSA en la movilización del Pb en órganos metabólicamente activos como hígado, riñón y fémur. Por otra parte en este estudio, los criterios de elección para trabajar con los diferentes órganos fueron varios. Se eligió el corazón porque además de ser uno de los órganos metabólicamente más activos, es un órgano muscular accesible y de buen tamaño y en donde pasa una gran cantidad del gasto cardíaco. La concentración de Pb en el corazón fue pequeña en los grupos de animales que sólo recibieron la dieta normal y la dieta de 0.1 % Ca en combinación con el DMSA., pero esta concentración se incrementó ligeramente en los animales que fueron intoxicados con Pb apreciándose una reducción de este en los animales que recibieron el quelante confirmando una movilización del metal.

La terapia de DMSA en los animales intoxicados con el Pb y que se mantuvieron con la dieta deficiente en calcio en la dosis de 30 mg/Kg/día durante los 5 días establecidos fue eficaz para reducir la carga del metal en bazo, órgano en el que se destruyen los eritrocitos y que es afectado por el Pb aumentando su carga probablemente porque la membrana de los eritrocitos se vuelve más frágil y al atravesar los canalículos del tejido retículo endotelial se fragmentan más fácilmente. Consecuentemente, las concentraciones del metal en el tejido esplénico en los animales intoxicados son mayores comparadas con los grupo controles

La movilización de Pb presente en hígado en los animales intoxicados con este metal y alimentados con la dieta deficiente en calcio se mostró claramente en los animales a los que se les administró DMSA. Se apreció la reducción de la carga tisular a menos de la mitad por efecto del DMSA

comparado con los animales que no se les administró este agente quelante. Se eligió trabajar con el hígado porque es uno de los órganos afectados en una buena parte por el Pb, y es el responsable de muchas biotransformaciones de sustancias extrañas y en él encontramos una gran cantidad de enzimas.

Se ha mencionado que la combinación de calcio bajo y Pb podría incrementar la carga tisular del Pb en fémur y riñón en comparación con una dieta normal (Bogden et al., 1992). En los riñones, la exposición se lleva a cabo por la filtración glomerular con una subsecuente reabsorción, además de la acumulación directa desde la sangre (Pappas et al., 1995). Es claro que el riñón, principal órgano excretor, es uno de los órganos más afectados en una intoxicación por Pb y en este estudio apreciamos la cantidad depositada del metal en éste órgano y que el DMSA oral fue efectivo en reducir la concentración del Pb incrementando su movilización, esto se apreció en la eliminación muy marcada del metal en orina.

Sabemos que el Pb se transporta por la sangre asociado a los eritrocitos en más del 95 % y el resto se halla disuelto en plasma. Un hecho importante es que el Pb tiene una afinidad por el tejido óseo en donde finalmente se deposita y en nuestros datos podemos observar la carga de Pb a nivel de fémur, representativo del tejido óseo. La cantidad de Pb depositado en tejido óseo está en relación con el crecimiento corporal., y el agente quelante fue capaz de reducir la carga del Pb en los animales intoxicados con este metal.

Cabe mencionar que la literatura reporta que el DMSA es un compuesto que tiene la particularidad de distribuirse extracelularmente, pudiendo penetrar en forma restringida al interior de la célula, esto en parte, se debe a que es una

molécula que a pH tisular se encuentra ionizado en sus grupos carboxilos lo que impide su paso a través de la membrana celular. En el presente estudio observamos que el DMSA administrado en 5 días por vía oral fue capaz de reducir la carga corporal de este metal con una marcada diuresis del mismo y dada su alta afinidad por este metal pesado, redujo la unión de este metal en los grupos -SH en los sistemas enzimáticos blanco disminuyendo su toxicidad. Tal vez se requiera más tiempo del tratamiento con el DMSA para hacer más patente una diferencia debida a la redistribución del metal, o de otra forma combinar el tratamiento con otros agentes quelantes, que son capaces de atravesar diferentes compartimientos tisulares.

7 CONCLUSIONES

El presente estudio nos permitió observar la efectividad del DMSA, administrado por vía oral en dosis de 30 mg/Kg/día durante 5 días, provocando cambios favorables como:

- 1.- Reducción de los niveles del metal en la sangre acompañada de una movilización en la carga en los diversos organos afectados, apreciándose una marcada diuresis del metal.
- 2.- El DMSA ocasionó la remoción de Pb de algunas enzimas inhibidas como la ALA-D observándose una disminución en la excreción de ALA en la orina.
- 3 - Disminuyó la concentración de PPF-IX en eritrocitos circulantes.
- 4.- Recuperación de los niveles de Hb y Hto

8 PERSPECTIVAS

En este trabajo se observó la movilización de Pb por efecto del DMSA en los distintos órganos afectados comúnmente por una intoxicación con este metal, presentando la ventaja de su administración, y la rapidez en el tratamiento, esto comparado con los quelantes que se han utilizado previamente en nuestro país. El trabajo no pretende señalar cómo reducir la contaminación del metal, pero sí presentar los resultados de un estudio sobre un antídoto que tenga poco o ningún efecto colateral indeseable y que sea más eficaz para la eliminación de este metal del organismo y contribuir en parte al conocimiento farmacológico del DMSA y tratar de acelerar la posibilidad de contar con él como medicamento en nuestro medio.

9 LITERATURA CITADA

Adrien, A. Selective Toxicity. The nature of chemical bonds. Absorption 6th Ed. Chapman & Hall., pp: 277-288, 1981.

Anonymous. Succimer- An oral drug for lead poisoning. Med. Lett. Drugs. Ther. 33: 78, 1991. Citado por Walker, 1992.

Aposhian, H. V. DMSA and DMPS-water soluble antidotes for heavy metal poisoning. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23: 193-215, 1983.

Aposhian, H. V., and Aposhian, M. M. Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid: chemical, pharmacological, and toxicological properties of an orally effective metal chelating agent. Ann Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 279-306, 1990.

Aposhian, H. V., Maiorino, R. M., Gonzalez, R. D., Zuñiga, Ch. M., Xu, Z., Hurlbut, K. M., Junco, M. P., Dart, R.C., and Aposhian, M. M. Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. Toxicology 97: 23-38, 1995.

Aub, J. C., Fairhall, L. T., Minot, A. S., and Reznikoff, P. Lead poisoning. In: Medicine. Monographs, vol. 7, Williams and Wilkins, Baltimore, 1926. Citado por Levander, 1979.

- Barton, J. C., Conrad, M. E., Harrison, L., and Nuby, S. Effects of calcium on the absorption and retention of lead. *J. Lab. Clin. Med.* 91: 366-376, 1978.
- Blumberg, W. E., Eisinger, J., Lamola, A. A., and Zuckerman, D. M. " The hematofluorometer ". *Clin. Chem.* 23: 270, 1977.
- Bogden, D. J., Gertner, S. B., Christakos, S., Kemp, F. W., Yang, Z., Katz, S. R., and Chu, C. Dietary calcium modifies concentrations of lead and other metals and renal calbindin in rats. *J. Nutr.* 122: 1351-1360, 1992.
- CDC. Center for Disease Control and Prevention. Preventing lead poisoning in young children. Atlanta, U.S. Department of Health and Human Services, 1991.
- Conrad, M E., and Barton, J. C. Factors affecting the absorption and excretion of lead in the rat *Gastroenterology* 74: 731-740, 1978.
- Correia, M A , y Becker, Ch E. Agentes quelantes e intoxicación con metales pesados *Farmacología básica y clínica.* 4° ed. Ed. El Manual Moderno., pp: 741-746, México., 1991.
- Cory-Slechta, D A., Weiss, B , and Cox, C. Mobilization and redistribution of lead over the course of calcium disodium ethylenediaminetetraacetate chelation therapy. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 243: 804-813, 1987.

Cory-Slechta, D. A. Mobilization and redistribution on lead over the course of DMSA chelation therapy and long term efficacy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 84-91, 1988.

Davis, J. R., and Andelman, S. L. " Urinary delta-aminolevulinic acid (ALA) levels in lead poisoning. A modified method for the rapid determination of urinary delta-aminolevulinic acid using disposable ion-exchange chromatography columns " *Arch. Environ. Health* 15: 53-59, 1967.

Desoille, H., Martí, M. J. A., Scherrer, J., and Truhaut, R. Plomo. *Medicina del trabajo*. Masson., pp: 332-338, 1986.

Dreisbach, R. H., y Robertson, W. O. *Manual de toxicología clínica. Prevención, diagnóstico y tratamiento*. 6°ed. Ed. El Manual Moderno., pp: 225-231, 1988

Dukes, H H , y Swenson, M. J. *Fisiología de los animales domésticos. (Tomo I)*. 4° ed. Ed. Aguilar., pp: 849-852, 1977.

Egorova, L. G *Complexing properties of dimercaptosuccinic acid. Complexing of lead with meso-dimercaptosuccinic acid*. *Zhr. Obshch. Khim.* 42: 2240-2245, 1972 Citado por Aposhian y Aposhian, 1990.

Ellenhorn, M. J , and Barceloux, D. G. *Lead. Medical Toxicology. Diagnosis and treatment of human poisoning*. Ed. Elsevier., pp: 1030-1042, 1988.

- Flora, S. J. S., and Tandon, S.K. Beneficial effects of zinc supplementation during chelation treatment of lead intoxication in rats. *Toxicology* 64: 129-139, 1990.
- Fox, J., Swaminathan, R., Murray, T. M., and Care, A. D. Role of the parathyroid glands in the enhancement of intestinal calcium absorption in response to a low calcium diet. *J. Endocr.* 74: 345-354, 1977.
- Friedheim, E., Da Silva, J. R., and Martins, A. V. Treatment of Schistosomiasis *Mansoni* with antimony-a, a-dimercapto-potassium succinate (TWSb). *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 3: 714-727, 1954. Citado por Aposhian, 1983.
- Friedheim, E., Graziano, J. H., Popovac, D., Dragovic, D., and Kaul B. Treatment of lead poisoning by 2,3-dimercaptosuccinic acid. *Lancet* 2: 1234-1236, 1978.
- Fullmer, C. S., and Rosen, J. F. Effect of dietary calcium and lead status on intestinal calcium absorption. *Env. Research* 51: 91-99, 1990.
- Gerber, G. B , and Deroo, J. Absorption of radioactive lead (^{210}Pb) by different parts of the intestine in young and adult rats. *Environ. Physiol. Biochem.* 5 314-318, 1975.
- Gilman, L. B., and Engelhart, W. G. Atomic spectroscopy advances. Recent Advances in microwave sample preparation. CEM Corporation. *Spectroscopy* Vol. 4, No. 8, 1989.

- Goldfrank, L. R., Osborn, H., and Hartnett, L. Lead. Toxicology emergencies. 4th Ed. Appleton-Lange., pp: 627-635, 1990.
- González, H. S. Efectividad del ácido 2,3-dimercaptosuccínico en un modelo de intoxicación por plomo durante una dieta con calcio bajo. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, N.L., 1994.
- González, R. D., Molina, B. G , y Zúñiga, Ch. M. A. Diagnóstico clínico. *Intoxicación por plomo*, IMSS. Ed. Molina., pp: 86-98, 1986.
- González, R. D., Zúñiga, Ch. M. A., y Narro, J. A. Movilización de plomo en pacientes con intoxicación crónica por el metal. Penicilamina oral. Arch. Invest. Méd. 21: 279-283, 1990.
- Goyer R. A. Toxic effects of metals. Toxicology. The basic science of poisons. 4th Ed. Pergamon Press., pp: 623-637, 1991.
- Goyer, R. A., Cherian, M. G., Jones, M. M., and Reigart, J. R. Role of chelating agents for prevention, intervention, and treatment of exposures to toxic metals. *Env. Health Perspectives* 103: 1048-1052, 1995.
- Graef, J. W , and Lovejoy, F. H. Heavy metal poisoning. *Environmental and occupational hazards*. Harrison's principles of internal medicine 12th Ed. McGraw-Hill, Inc., pp: 2184-2185, 2186-2187, 1991.

- Grandjean, P., Jacobsen, I. A., and Jorgensen, P. J. Chronic lead poisoning treated with dimercaptosuccinic acid. *Pharmacology & Toxicology* 68: 266-269, 1991.
- Graziano, J. H., Leong, J. K., and Friedheim, E. 2,3-dimercaptosuccinic acid: a new agent for the treatment of lead poisoning. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 206: 696-700, 1978.
- Graziano, J. H., Siris, E. S., Lolacono, N., Silverberg, S. J., and Turgeon, L. 2,3-Dimercaptosuccinic acid as an antidote for lead intoxication. *Clin. Pharmacol. Ther.* 37: 431-438, 1985.
- Halloran, B. P., and DeLuca, H. F. Calcium transport in small intestine during pregnancy and lactation. *Am. J. Physiol.* 239: E64-E68, 1980.
- Harper, H. A., Rodwell, V. W., y Mayes, P. A. *Manual de Química Fisiológica*. 7ª ed. Ed. El Manual Moderno., pp: 633-636, 1980.
- Hessel, D. W. " A simple and rapid quantitative determination of lead in blood ". *Atomic Absorption Newsletter* 7: 55, 1968.
- Jones, M. M., Basinger, M. A., Gale, G. R., Atkins, L. M., Smith, A. B., and Stone, A. Effect of chelate treatment on kidney, bone and brain lead levels of lead intoxicated mice. *Toxicology* 89: 91-100, 1994.

- Kapoor, S. C., Wielopolski, L., Graziano, J. H., and Lolocono, N. J. Influence of 2,3-dimercaptosuccinic acid on gastrointestinal lead absorption and whole-body lead retention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 97: 525-529, 1989.
- Klaassen, C. D. Heavy metals and heavy-metal antagonists, in Gilman, A. G., Rall, T. W., Nies, A. S., and Taylor, P. (Eds), *The pharmacological basis of therapeutics*. 8th Ed. Pergamon Press., pp: 1592-1614, 1991.
- Kostial, K., Simonovic, J., and Pisonic, M. Lead absorption from the intestine in newborn rats. *Nature* 233: 564, 1971.
- Lederer, J. G., and Bing, F. C. Effect of calcium and phosphorus on retention of lead by growing organism. *J. Am. Med. Assoc.* 114: 2457-2461, 1940.
- Levander, O. A. Lead toxicity and Nutritional Deficiencies. *Env. Health Perspectives* 29: 115-125, 1979.
- Lewis, R. Metals Lead. *Occupational medicine*. Ed. LaDou, J. Appleton & Lange., pp. 306-310, 1990
- Liang, Y., Chu, C., Tsen, Y., and Ting, K. Studies on antibilharzial drugs. VI. The antidotal effects of sodium dimercaptosuccinate and BAL-glucoside against tartar emetic. *Acta Physiol. Sin.* 21: 24-32, 1957. Citado por Aposhian, 1983.
- Lynch, M. J., Raphael, S. S., Mellor, L. D., Spare, P. D., y Inwood, M. J. H. *Métodos de laboratorio* 2^a ed. Ed. Interamericana., pp: 752-755, 1972.

- Mahaffey, K. R., Goyer, R., and Haseman, J. K. Dose-response to lead ingestion in rats fed low dietary calcium. *J. Lab. Clin. Med.* 82: 92-100, 1973.
- Meredith, P. A., Moore, M. R., and Goldberg, A. The effect of calcium on lead absorption in rats. *Biochem. J.* 166: 531-537, 1977.
- Molina, B. G., González, R. D., y Zúñiga, Ch. M. A. Tratamiento. Intoxicación por plomo. Ed. G. Molina, IMSS., pp: 99-110, 1986, México.
- Moore, M. R., Meredith, P. A., and Goldberg, A. Lead and Heme Biosynthesis. Lead Toxicity. Singhal, R. L., and Thomas, J. A (Eds.). Urban & Schwarzenberg, Baltimore., pp: 86-88, 1980.
- Pappas, J. B., Ahlquist, J. T., Allen, E. M., and Banner, W. Oral dimercaptosuccinic acid and ongoing exposure to lead: effects on heme synthesis and lead distribution in a rat model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133: 121-129, 1995.
- Quaterman, J , Morrison, J N., and Humphries, W. P. The influence of high dietary intakes of calcium on lead retention and release in rats., 34: 89A-90A, 1975
- Quer-Brossa, S Los Metales. Toxicología industrial. Ed. Salvat., pp: 19-40, 1983

- Rivera, M., Zheng, W., Aposhian, H. V., and Fernando, Q. Determination and metabolism of dithiol-chelating agents: VIII. Metal complexes of mesodimercaptosuccinic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 100: 96-106, 1989.
- Sánchez-Anzaldo, F. J. Aspectos bioquímicos de la intoxicación por plomo. Contaminación ambiental por plomo en áreas industriales. *Gaceta Médica de México* 113: 221-223, 1977.
- Silbergeld, E. K. Interactions of lead and calcium on the synaptosomal uptake of dopamine and choline. *Life Sciences* 20: 309-318, 1977.
- Six, K. M., and Goyer, R. A. Experimental enhancement of lead toxicity by low dietary calcium. *J. Lab. Clin. Med.* 76: 933-942, 1970.
- Skerfving, S. Biological Monitoring of exposure to inorganic lead. *Biological Monitoring of toxic metals. Rochester Series on Environmental Toxicity Press*, pp. 169-196, 1988.
- Sorrell M., Rosen, J. F., and Roginsky, M. Interactions of lead, calcium, vitamin D and nutrition in lead-burdened children. *Arch. Environ. Health* 7: 160-164 1976
- Toraason, M. A., Barbe, J. S., and Knecht, E. A. Maternal lead exposure inhibits intestinal calcium absorption in rats pups. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 60: 62-65, 1981

Waldron, H. A., and Stofen, D. Subclinical lead poisoning. Academic Press, London., pp: 224, 1974.

Walker, E. M., Stone, A., Milligan, L. B., Gale, G. R., Atkins, L. M., Smith, A. B., Jones, M. M., Singh, P. K , and Basinger, M. A. Mobilization of lead in mice by administration of monoalkyl esters of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid. *Toxicology* 76: 79-87, 1992.

WHO. World Health Organization. Diseases caused by lead and its toxic compounds., pp: 85-90, 1986.

Zar, J. H. Biostatistical Analysis. 2^a ed. Ed. Prentice Hall, New Jersey, 1984.

Zhao-Fa, X., and Jones, M. M. Comparative mobilization of lead by chelating agents *Toxicology* 53: 277-288, 1988.

Zinterhofer, L. J M., Jatlow, P. I., and Fappiano, A. " Atomic absorption determination of lead in blood and urine in the presence of EDTA " *J Lab Clin Med* 78: 664, 1971.

