

Efecto del plomo sobre aprendizaje y memoria de ratas adultas, en un modelo subagudo

Concepción Nava-Ruiz¹, Marisela Méndez-Armenta¹, Camilo Ríos Castañeda²

RESUMEN

El plomo (Pb^{2+}) es un elemento sin ninguna función biológica en el organismo humano, siendo tóxico para éste incluso en pequeñas cantidades; se han realizado esfuerzos a nivel mundial para disminuir la exposición a través de la regulación, pero las exposiciones aún persisten, por lo que el plomo es considerado un problema de salud pública. Este metal es reconocido en particular por sus efectos tóxicos en el sistema nervioso central (SNC), ya que en el caso de la población adulta con exposición laboral, se observan alteraciones en la conducta como resultado de altos niveles de plomo en la sangre. Diferentes mecanismos están involucrados en la neurotoxicidad causada por el plomo; entre ellos la capacidad del metal para inhibir o mimetizar las acciones del calcio (Ca^{2+}) afectando la regulación de las funciones celulares mediadas por calcio. En este trabajo se analizaron los efectos de la administración subaguda del plomo sobre el aprendizaje y memoria de ratas adultas; así como, en la morfología del tejido hipocampal. El plomo fue administrado en diferentes dosis en el agua de bebida a ratas adultas de la cepa *Wistar* por 14 días, después de los cuales se evaluó la conducta de las ratas utilizando el laberinto acuático de Morris. Los resultados mostraron que el plomo no afecta el aprendizaje al contrario de lo observado en la evaluación de la memoria en donde encontramos diferencias significativas en los grupos con las dosis más altas de plomo, observándose lo mismo en el análisis histopatológico.

Palabras clave: plomo, aprendizaje, memoria, neurotoxicidad.

Effect of Pb^{2+} on learning and memory in adult rats after a subacute exposure

ABSTRACT

Lead (Pb^{2+}) is an element with no biological function in the human, and has been recognized as a dangerous neurotoxin, even at low levels of exposure; despite efforts to reduce exposure through regulation, lead is considered a significant public health concern. Lead is recognized by its toxic effects on several organ and systems, of particular importance, the central nervous system. Adult population with occupational exposure present abnormalities in a number of measures in neurobehaviour, with accumulative exposure, resulting from high blood levels; multiple mechanisms may be involved in lead-induced neurotoxicity; one of the most important is the ability of lead to mimic or in some cases inhibit the action of calcium (Ca^{2+}) as a regulator of cell function. In this work, we studied the effect of subacute lead administration on learning and memory, as well as morphological changes in the hippocampus of adult rats exposed. Lead acetate was given in different doses via drinking water to adult male *Wistar* rats for 14 days. To determine if administration of lead result in impairments in learning and memory the Morris water maze paradigm was used, and a histopathological study to evaluate the effect of lead on hippocampal tissue. The results in this work demonstrated that learning no was affected in any doses of lead with respect to control group, the memory showed significative differences in high doses of lead with respect to control group, likewise, histopathological changes in the hippocampus were observed in high doses groups with respect to control group.

Key words: lead acetate, learning, memory, neurotoxicity.

El plomo se encuentra ampliamente distribuido en el entorno de manera natural debido a que al igual que otros contaminantes llega a diferentes regiones por acción del viento depositándose en el suelo, agua y en la vegetación¹. En los últimos tres siglos, los niveles de plomo en el medio ambiente se han incrementado más de 1000 veces observándose el aumento más grande entre 1950 y 2000, esto como resultado de la actividad humana, ya que su uso en diversas actividades mineras y comerciales implican procesos de extracción, fundición y refinación del metal, así como, también el procesamiento de minerales no ferrosos e introducción de compuestos orgánicos de plomo utilizados entre otros usos como aditivos antidetonantes en la gasolina o como base de pinturas, o como resultado de la quema de combustibles fósiles, además de su amplio uso en la cerámica vidriada³⁻⁵. En México, los problemas de salud asociados al plomo, inicialmente tenían relación con la exposición a compuestos inorgánicos del metal; durante los ochenta, los niveles de plomo en México por el uso de la gasolina plomada fluctuaban entre 20.3 mg/100 ml y 16.3 mg/100 ml^{6,7}, niveles muy altos de acuerdo al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades⁸ de los Estados Unidos de Norteamérica, el cual en 1991, determinó que los niveles de plomo en la sangre para el ser humano mayores a 10 mg/dl eran causa de preocupación por los efectos producidos por el metal. En México, los valores permisibles establecidos por la Norma Mexicana y marcados como el límite máximo oficial para el plomo atmosférico por la Secretaría de Salud⁹ son de 1.5 mg/m³ (1.5 ppm). Los efectos que el plomo tiene sobre el organismo humano se relacionan entre otros factores con el tipo de exposición al metal, la cual puede ser crónica o aguda; la toxicidad causada por una exposición aguda es menos común que la exposición crónica y usualmente se manifiesta como dolor de cabeza irritabilidad, dolor abdominal y signos neurológicos, mientras que en la exposición crónica es caracterizada por encefalopatía presentando pérdida de consciencia, atención disminuída, vómito, convulsiones y coma^{2,6,8,10}.

Como se ha mencionado con antelación, uno de los principales sistemas que se ve afectado por la intoxicación con plomo es el sistema nervioso central, el cual es especial susceptible a sus efectos, ya que pueden presentarse alteraciones conductuales traducidos en hiperactividad, dificultad en el aprendizaje y concentración, así como déficit cognitivo con un IQ reducido¹¹. El hipocampo es la estructura anatómica responsable de los diferentes procesos de la memoria que incluyen la separación espacial y temporal de eventos; dicha separación está asociada con varios tipos de formación de aprendizaje y memoria a través de la potenciación a

largo plazo la cual puede durar desde horas a días y que se cree contribuye a las formas declarativas del aprendizaje tales como aprendizaje espacial¹¹⁻¹⁴.

El hipocampo es una de las regiones cerebrales que más se afecta o es vulnerable al plomo, estudios experimentales indican que el plomo se acumula en varias regiones cerebrales y está altamente concentrado en esta región cerebral^{15,16}, Carpenter, *et al*¹⁷, encontraron que el plomo puede bloquear la LTP a concentraciones micromolares en ratas expuestas a plomo. En 1998, Finkelstein¹⁸ reportó cambios morfológicos que hacen referencia a un incremento significativo en el tamaño y densidad numérica de las fibras musgosas en el hipocampo de ratas expuestas a plomo durante la lactancia, en este modelo experimental los niveles de plomo en sangre fueron de 20 mg/dl. En México existen pocos estudios de los efectos causados por el plomo en humanos adultos y la mayor parte de ellos están enfocados a determinar los factores de riesgo relacionados a los elevados niveles del metal en la sangre, o bien, de la relación de los niveles de plomo en sangre dirigido a huesos y plasma¹⁹. Experimentalmente, también son pocos los estudios sobre la toxicidad del plomo y sus efectos en animales adultos con exposiciones crónicas o subagudas. En estudios realizados, se ha reportado que en ratas en desarrollo y/o adultas expuestas a diferentes dosis y periodos de tiempo a plomo existen efectos del metal traducidos en déficits en el aprendizaje y/o la memoria²⁰⁻²²; esto es muy importante porque los problemas de intoxicación ocasionados por el plomo actualmente en México afectan principalmente a individuos adultos involucrados en actividades comerciales relacionadas con el metal, esta población es conocida como ocupacionalmente expuesta debido a que las fuentes primarias de exposición están relacionadas en su mayoría con actividades que afectan a quienes laboran en la minería o industria, que incluyen procesos de extracción, fundición y refinación del metal, o bien por la cercanía de su residencia a fundidoras de plomo; así mismo, siendo de igual importancia la participación de trabajadores o alfareros en la fabricación de loza de cerámica vidriada, aunque esta exposición afecta principalmente a la población rural como se demostró con los estudios realizados por Hernández-Ávila²³ y Rojas-López²⁴,

Recibido: 3 noviembre 2011. Aceptado: 18 noviembre 2011.

¹Laboratorio de Neuropatología Experimental, ²Departamento de Neuroquímica, ³Laboratorio Neuropatología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez. Correspondencia: Marisela Méndez-Armenta. Laboratorio Neuropatología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Insurgentes Sur # 3877. 14269 México, D. F. E-mail: mmendezarmenta@hotmail.com

la población urbana también está expuesta; los estudios realizados en estas poblaciones, demostraron que los alfareros así como sus familias mostraban altos niveles de plomo en sangre. Por lo anterior, en este trabajo nos interesa estudiar el efecto de la administración subaguda de acetato de plomo sobre el aprendizaje y la memoria de las ratas adultas expuestas a plomo utilizando un modelo subagudo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales tratados

El estudio fue llevado a cabo utilizando ratas macho de la cepa *Wistar*, con un peso aproximado de 250 g, bajo condiciones de temperatura constante (25 °C), humedad (10%) y luz (12:12 h, ciclo luz: oscuridad). Los animales fueron colocados en cajas de acrílico, con alimento estándar para roedores (Purine Chow) y agua *ad libitum*. Se manejaron tres grupos tratados con acetato de plomo en el agua de bebida a concentraciones de 125, 250 y 500 ppm, respectivamente, además de un grupo control al que solo se le administró agua desionizada. Las ratas fueron mantenidas en las mismas condiciones experimentales durante todo el estudio; la exposición al plomo fue de 14 días al cabo de los cuales las ratas fueron evaluadas y sacrificadas.

Prueba de aprendizaje

Para evaluar el efecto del plomo sobre el aprendizaje y la memoria, se utilizó el laberinto acuático de Morris, el cual es un modelo utilizado para el estudio de la memoria espacial en roedores. El laberinto acuático, consistió en una alberca redonda, llena de agua y con una temperatura de 22 a 24°C, en la que se puso una plataforma hecha de acrílico transparente con un diámetro de 10cm, y sumergida 2 cm por debajo del nivel del agua, esta plataforma llamada plataforma de escape debía ser localizada por el animal. Las medidas de la alberca utilizada en este ensayo fueron de 2 m de diámetro con una altura de 40 cm de alto²⁵. De acuerdo al método tradicional, el agua de la alberca se volvió opaca utilizando leche, lo que impidió que el animal viera la plataforma de escape. Un día antes de comenzar el experimento (en el día 14 de exposición), las ratas fueron puestas en la alberca con agua para su habituación, cada rata permaneció en la alberca un minuto, durante el cual se guiaba al animal con la mano hasta la plataforma para que se subiera en ella y aprendiera a escapar del agua, al término de este tiempo se sacaba a la rata y se le colocaba nuevamente en su caja. La capacidad del animal para localizar la plataforma correctamente

depende de la utilización de las claves o señales que rodean la piscina, siendo necesarias al menos dos señales extra-laberinto para localizar la meta invisible²⁶.

La prueba del laberinto en la fase de aprendizaje o adquisición, consistió en una tarea espacial en la que los animales nadaron desde diferentes puntos de salida situados en el perímetro de la alberca, se introdujo al animal de cara hacia la pared de la alberca, una vez que el animal era colocado en el agua, se accionaba un cronómetro para registrar el tiempo de llegada a la plataforma, dando dos minutos como tiempo máximo para lograrlo, si en ese tiempo la rata no conseguía salir se registraba el intento como un fracaso, se sacaba del agua y se colocaba sobre la plataforma durante treinta segundos para que reconociera la ubicación de esta e iniciar el segundo intento hasta completar cuatro intentos; en caso de que el animal encontrara la plataforma antes de los dos minutos se registraba el tiempo, se le sacaba de la alberca para colocarla sobre la plataforma durante treinta segundos, al término de este tiempo se colocaba a la rata nuevamente en su caja dejándola descansar durante un minuto y se continuaba con el siguiente intento. Durante el ensayo de aprendizaje se evaluó la latencia de escape, que es el tiempo en segundos que transcurre hasta que la rata alcanza la plataforma y sube a ella.

Prueba de memoria

La segunda parte de la aplicación de la prueba del laberinto acuático, correspondió a la fase de memoria, la cual consistió en colocar a los animales nuevamente en la alberca con el agua pero sin la plataforma; el lugar en donde inicialmente se encontraba la plataforma, fue denominada área blanco. Esta es una prueba de preferencia espacial en la que si el animal ha aprendido, nadará más tiempo en el cuadrante en donde originalmente se encontraba la plataforma, este cuadrante es llamado cuadrante meta. En esta fase, se contabilizó el tiempo que pasó la rata en el cuadrante meta, así como los cruces que realizó la rata sobre el área blanco durante un minuto y en un intento. Las ratas fueron colocadas en la alberca al azar y en los mismos puntos de salida utilizados en la primera fase de la prueba.

El esquema general de la aplicación de la prueba de Morris para evaluar el aprendizaje y la memoria se realizó de la siguiente manera: 5 días continuos para evaluar aprendizaje, un día de descanso o sin actividad (día 6) y 1 día más para evaluar la memoria (día 7), el ensayo se llevó a cabo siempre en el mismo lugar e iniciando a la misma hora del día, con los mismos observadores y sin modificar ningún objeto del área en donde se realizó el ensayo para evitar factores de distracción que alteraran el comportamiento de los animales.

Evaluación del daño morfológico

Para el estudio histopatológico, se utilizaron las ratas que fueron evaluadas en la prueba de aprendizaje y memoria, las cuales al finalizar el ensayo de conducta, fueron sacrificadas de la siguiente manera: primero fueron anestesiadas con 0.3 ml de hidrato de cloral al 3.5 % i.p., después fueron perfundidas a través del corazón con solución salina fría seguida de una solución de formaldehído al 10% a 4°C; los cerebros fueron disecados y mantenidos en la solución de formaldehído al 10% por 24 horas; posteriormente el tejido fue deshidratado utilizando concentraciones crecientes de alcoholes (60, 70, 80, 90 y 100%) y aclaramiento con xilol, para continuar con la inclusión del tejido en parafina; una vez incluido el tejido se realizaron cortes de 5 mm de espesor los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina para finalmente ser montados con resina sintética (Entellán, Merck). Los cortes fueron observados en el microscopio de luz para analizar el daño morfológico en el hipocampo producido por el acetato de plomo. Los criterios generales para evaluar cualitativamente el daño en neuronas incluyeron núcleos picnóticos, vacuolización citoplásmica, edema y atrofia neuronal.

RESULTADOS

Prueba de aprendizaje

Después de la aplicación de la prueba de laberinto de agua de Morris (Water-maze) para evaluar el aprendizaje, se analizaron los resultados obtenidos y se observó que no existió una diferencia significativa entre los grupos tratados con respecto al grupo control durante los cinco días de aplicada la prueba. Lo anterior se puede observar en la gráfica de la figura, en donde se aprecia claramente la disminución en el promedio de la latencia de escape del grupo control (75.5, 26.4, 13.4, 7.5, 8), del grupo de 125 ppm (83.4, 32.8, 26, 18.7, 11.4), del grupo de 250 ppm (95.8, 36.2, 31.5, 14.3, 14) y del grupo de 500 ppm (104.2, 40.4, 20, 12, 12).

Prueba de memoria

En la segunda parte de la prueba del laberinto acuático y después de dejar descansar un día a los animales, se continuó con la fase correspondiente a la memoria, como ya se mencionó, en esta prueba se evalúa si el animal aprendió a escapar de la plataforma, por lo que si retuvo la información, entonces nadaría más tiempo en el cuadrante en donde estaba la plataforma. Al contabilizar el tiempo que pasó la rata en el cuadrante meta se obtuvieron los siguientes resultados: los tres

grupos expuestos al acetato de plomo (125 ppm, 250 ppm y 500 ppm) mostraron una diferencia significativa con respecto al grupo control (figura 1). En cuanto a los resultados referentes a los cruces que realizó la rata sobre el área blanco se puede observar que también los tres grupos expuestos al plomo mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control ya que existió una disminución en el número de cruces (figura 2).

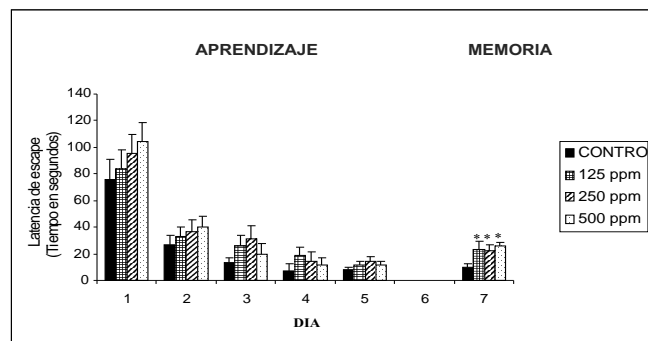


Figura 1. Evaluación del aprendizaje y memoria, usando la prueba de laberinto de agua. Cada barra representa el promedio \pm ES de 8 animales por grupo experimental y para las dos fases. * $p < 0.05$ vs grupo control. ANOVA de una y dos vías respectivamente seguida de una prueba de Dunnett.

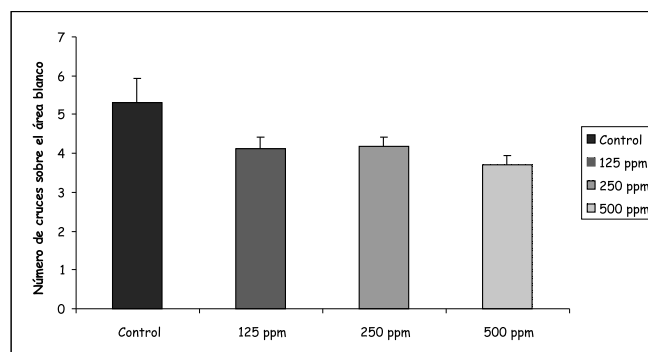


Figura 2. Número de cruces durante la fase de memoria en el día 7. Cada barra representa el número de cruces sobre el área blanco por grupo y la dispersión de datos de cada uno de ellos. Se observan diferencias significativas de los grupos experimentales de 250 y 500 ppm con respecto al grupo control (*), $p < 0.05$. Análisis de varianza, seguida de una prueba de Dunnett.

Análisis morfológico en tejido hipocampal

Los resultados obtenidos en este estudio, mostraron que el análisis histopatológico del tejido de las ratas del grupo control se encontró conservado, sin daño celular en las capas del hipocampo incluyendo a las células piramidales, no se observaron células picnóticas o células retraídas, tampoco se observó edema; resultados similares se observaron en el grupo con la dosis de 125 ppm, por el contrario, en los grupos tratados con el acetato de plomo, se observan cambios morfológicos

localizándose el daño celular principalmente en neuronas, de los grupos tratados con 250 ppm y 500 ppm, este daño, consistió principalmente en picnosis y atrofia neuronal en las capas CA2 y CA3, en estos grupos, las células piramidales, se muestran hiper cromáticas, además de observarse ligero edema en el grupo de 500 ppm, no se aprecia infiltrado inflamatorio el cual es determinado por la presencia de linfocitos y neutrófilos (figura 3).

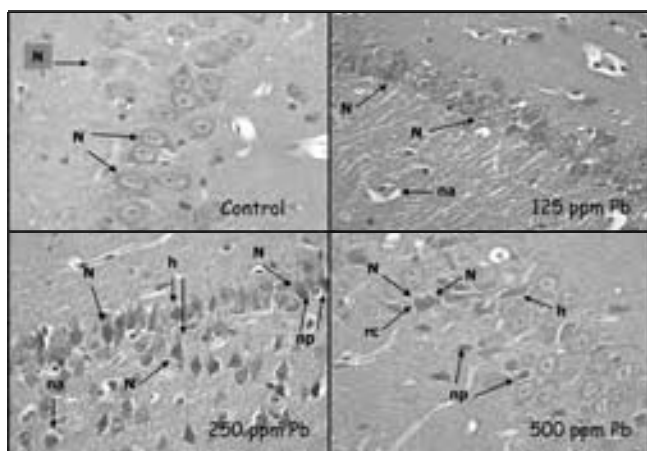


Figura 3. Tejido hipocampal, grupo control sin daño neuronal (N), en los grupos tratados con acetato de plomo (125, 250 y 500 ppm) se aprecia daño neuronal, además de atrofia neuronal (an), vacuolización citoplásmica (vc), se aprecia hiper cromatismo (h), además de observarse núcleos picnóticos (np). Tinción de H-E, 400x.

DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó el efecto del plomo sobre el aprendizaje y la memoria de ratas adultas, los resultados obtenidos demostraron que no hubo diferencias significativas entre los grupos tratados con plomo cuando fueron comparados con el grupo control, es importante notar como a través del desarrollo de la prueba, la latencia fue disminuyendo para el grupo control y los grupos expuestos de manera muy similar, por lo que podemos dilucidar que para este modelo no existen efectos del plomo sobre el aprendizaje. Quizás el aprendizaje no se encuentra alterado debido a que las ratas utilizadas para este estudio son jóvenes adultas y en esta edad ya se encuentra bien desarrolladas y estructurada la barrera hematoencefálica. Se sabe que en humanos existen anomalías funcionales o estructurales cerebrales en intoxicaciones agudas y crónicas producidas por el plomo^{27,28}; diferentes estudios han demostrado que la astrogliosis puede acumular y almacenar plomo además de mencionar que los astrocitos son más resistentes al efecto tóxico del metal que otras células del sistema nervioso central²⁹. Estos hallazgos

sugieren que los astrocitos pueden tener mecanismos compensatorios que le permiten a la célula adaptarse al plomo, ya que una de las características más comunes de los astrocitos en respuesta al daño, es su reacción a través de una gliosis reactiva junto con cambios morfológicos, además de observarse un incremento en la síntesis de muchas proteínas entre las que se encuentra la proteína glial fibrilar ácida (PGFA)^{30,31}, por lo que la observación del incremento de la PGFA sugiere un efecto selectivo del plomo en regiones específicas cerebrales y apoya los estudios relacionados con ratas adultas³². Debido a esto se ha propuesto que los astrocitos protegen a las neuronas contra las manifestaciones tóxicas del plomo por una acumulación y secuestro en compartimentos celulares³³, esta reacción está relacionada con la activación de algunos procesos celulares y enzimas específicas³⁴; entonces la toxicidad aguda producida por el plomo en cerebros de ratas adultas estaría induciendo la astrogliosis o gliosis reactiva mostrando características neuroprotectoras en los estados iniciales después del daño tóxico.

Sin embargo, cuando se realizó la segunda fase correspondiente a la evaluación de la memoria (consolidación del aprendizaje adquirido), se observó que a diferencia de la prueba de aprendizaje, en la prueba de memoria sí hubo diferencias significativas en los grupos de 250 y 500 ppm con respecto al grupo control, ya que tanto la latencia y el número de cruces por el área blanco se incrementaron en los grupos tratados con dosis más altas de plomo, incluso en la evaluación de cruces por el área blanco ya se observan diferencias desde el grupo de 125 ppm, lo que nos indica que los animales recordaron menos el lugar en donde se encontraba la plataforma colocada, la cual habían aprendido a localizar durante la etapa de aprendizaje, esta diferencia en la prueba de memoria demuestra que las ratas adultas de los grupos tratados con 250 y 500 ppm de acetato de plomo muestran alteraciones en el proceso de la memoria de manera significativa. Estos resultados están de acuerdo con el trabajo realizado por García-Arenas, *et al*⁶, quienes manejaron un modelo experimental similar al de este trabajo y en el que la memoria si está afectada de manera significativa en roedores adultos expuestos al acetato de plomo, ellos además demostraron en su estudio que la inducción de la LTP fue modificada de manera dosis-dependiente en ratas adultas expuestas. Zhao, *et al*³⁵, reportaron la alteración de la amplitud de la LTP en las rebanadas hipocampales expuestas al plomo, demostrando que la exposición a niveles bajos de este metal podrían reducir la plasticidad estructural en los adultos vía neurogénesis. El plomo está relacionado con la interferencia de los procesos celulares dependientes de Ca²⁺, que convergen sobre

factores de transcripción específicos (CREB), con lo que se podría explicar por qué la memoria se encuentra afectada por la exposición al plomo³⁶. Se sabe que en modelos experimentales usando bajas dosis de acetato de plomo, la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) se encuentra afectada. Uno de los principales mecanismos de toxicidad del plomo en el organismo, es la suplantación de cationes polivalentes gracias a la similaridad química, lo que resulta en interacciones con los grupos que coordinan los cationes polivalentes en las proteínas, que en ocasiones muestran más afinidad que la del propio ión suplantado, siendo ejemplos de esto el calcio y el zinc (Ca^{2+} y Zn^{2+})³⁷.

Los resultados obtenidos al realizar el análisis histopatológico nos indican que el plomo si afecta la morfología de las neuronas del hipocampo, debido al daño celular causado por el metal, el cual fue significativo en los grupos con las dos dosis más altas de plomo (250 ppm y 500 ppm). De acuerdo a Cory³⁸, existen diferencias de sensibilidad en las regiones cerebrales por intoxicación con plomo, por lo que en este trabajo con nuestros resultados histológicos podemos decir que el hipocampo morfológicamente es sensible a la intoxicación, además podemos concluir que el plomo, en las dosis utilizadas, no afecta el aprendizaje en las ratas, pero sí altera la memoria de corto plazo.

REFERENCIAS

1. Tong S, Von Schirnding YE, Prapamoto T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bulletin of the World Health Organization* 2000; 78:1068-77.
2. Agency for Toxic Substance and Disease Registry (ATSDR), Toxicological Profile for Lead, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Diseases Control, Atlanta, GA, 2007.
3. Mushak P, Davis JM, Crocetti AF, Grant LD. Prenatal and postnatal effects of low-level lead exposure: integrated summary of a report to the US Congress on childhood lead poisoning. *Environ Res* 1989; 50:11-36.
4. Lin S, Hwang S, Marshall EG. Fertility rates among lead workers and professional bus drivers: a comparative study. *Ann Epidemiol* 1996; 6:201-8.
5. Agency for toxic substance and disease registry (ATSDR). Toxicological Profile for Lead, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Diseases Control, Atlanta, GA. 2005.
6. Bellinger CD, Bellinger MA. Childhood lead poisoning: the torturous path from science to policy. *J Clin Invest* 2006; 116: 853-957.
7. Environmental Protection Agency U.S., Air quality criteria for lead Volume I and II of II, Research Triangle Park NC: National Center for Environmental Assessment-RTO Office, 2006.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Screening young children for lead poisoning: guidance for state and local public health officials. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, CDC Childhood Lead Poisoning Prevention Program. Nov 1997.
9. SSA NOM-026-SSA1-1993. Criterios para evaluar la calidad del aire ambiente con respecto al plomo (Pb). Valor normado para la concentración de plomo (Pb) en el aire ambiente como medida de protección a la salud de la población. Diario Oficial de la Federación, 23 Dic. 1994.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Blood lead levels-United States 1999-2002. *MMWR* 2005; 54:513-6.
11. White LD, Cory-Slechta DA, Gilbert ME, Tiffany-Castiglioni E, Zawia NH, Virgolini M, et al. New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;225:1-27.
12. Squire LR. Memory and brain. Oxford University Press, New York 1987.
13. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 2001;294:1030-8.
14. Johnston MV, Alemi L, Harum KH. Learning, memory, and transcription factors. *Pediatric Res* 2003;53:369-374.
15. Villeda-Hernández J, Barroso-Moguel R, Méndez-Armenta M, Nava-Ruiz C, Huerta-Romero R, Ríos C. Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain Res Bull* 2001;55:247-51.
16. García-Arenas G, Ramírez-Amaya V, Balderas I. Cognitive deficits in adult rats by lead intoxication are related with regional specific inhibition of cNOS. *Behav Brain Res* 2004;149:49-59.
17. Carpenter DO, Matthews MR, Parsons PJ. Long-term potentiation in the piriform cortex is blocked by lead. *Cell Mol Neurobiol* 1994;14:723-33.
18. Flores J, Albert LA. Environmental lead in Mexico, 1990-2002. *Rev Environ Contam Toxicol* 2004;181:37-109.
19. O'Dell T J, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. Test of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:11285-9.
20. Jett DA, Kuhlmann AC, Farmer SJ. Age-dependent effects of developmental lead exposure on performance in the Morris water maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;57:271-9.
21. Kuhlmann AC, McGlothlan JL, Guilarte TR. Developmental lead exposure causes spatial learning deficits in adult rats. *Neurosci Lett* 1997;233:101-4.
22. Hernández-Avila M, Romieu I, Ríos C, Rivero A, Palazuelos E. Lead-glazed ceramics as major determinations of blood lead levels in Mexican women. *Environ Health Perspect* 1991;94:117-20.
23. Rojas-López M, Santos-Burgoa C, Ríos C, Hernández-Avila M, Romieu I. Use of lead-glazed ceramics is the main factor associated with high lead in blood levels in two Mexican rural communities. *J Toxicol Environ Health* 1994;42:45-52.
24. Nerad L, Ramírez A, Ormsby CE, Bermúdez R. Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning. *Neurobiol Learn Mem* 1996;66:44-50.
25. Prados J, Trobalon JB. Locating an invisible goal in a water maze requires at least two landmarks. *Psychobiology* 1998;26:42-8.
26. Niklowitz, W. Subcellular mechanisms in lead toxicity: significance in childhood encephalopathy, neurological sequelae, and late dementias. In: Rozin, L., Shiraki, H., Gréevia, N. (Eds.), *Neurotoxicol Raven Press*, New York. 1977;289-98.
27. Rönnbäck L, Hansson E. Chronic encephalopathies induced by mercury or lead: aspects of underlying cellular and molecular mechanisms. *Br J Ind Med* 1992; 49:233-40.
28. Tiffany-Castiglioni E. Cell culture models for lead toxicity in neuronal and glial cells. *Neurotoxicol* 1993;14:513-36.
29. Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CFTI. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res* 1992;17:877-85.
30. Norenberg MD. Reactive astrocytosis. In: Aschner M, Kimelberg HK. (Eds.), *The Role of Glia in Neurotoxicity*. Boca

- Raton CRC Press, New York, 1996, 93-107.
31. Van Den Berg KJ, Lammers JHCM, Hoogendijk EMG, Kulig BM. Changes in regional brain GFAP levels and behavioral functioning following subchronic lead acetate exposure in adult rats. *Neurotoxicology* 1996;17:725-34.
 32. Holtzman D, DeVries C, Nguyen H, Olson J, Bensch K. Maturation of resistance to lead encephalopathy: cellular and subcellular mechanisms. *Neurotoxicology* 1984;5:211-25.
 33. Stryżyńska L, Bubko I, Walski M, Rafałowska U. Astroglial reaction during the early phase of acute lead toxicity in the adult rat brain. *Toxicology* 2001;165:121-31.
 34. Zhao Y, Brandish PE, Ballou PD. A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:14753-8.
 35. Chetty CS, Reddy GR, Murthy KS, Johnson J, Sajwan K, Desai D. Perinatal lead exposure alters the expression of neuronal nitric oxide synthase in rat brain. *Int J Toxicol* 2001;20:113-20.
 36. Gwaltney-Brant SM. Heavy Metals. In: Handbook of toxicologic pathology. Eds. Haschek WM, Rosseaux CG, Wallig AM. Academic Press New York 2002;701-32.
 37. Cory-Slechta DA. Relationships between lead-induced learning impairments and changes in dopaminergic, cholinergic, and glutamatergic neurotransmitter system functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:391-415.