

## Efectos teratogénicos del plomo

R. M. CORO ANTICH Y M. AMOEDO MON

*Inst. de Cardiología y Cirugía Cardiovascular*

Recibido: 27 de diciembre de 1977

**ABSTRACT.** There are 150 industrial processes in Cuba related to lead. Moreover, recent worldwide papers on the subject report increasing concentrations of lead in the atmosphere, which convert lead compounds into environmental pollutants. In this paper the action of lead nitrate on pregnant rats is analyzed. From each mother, the following data were registered: implantation sites, living embryos, dead embryos, and reabsorptions. The embryos were macroscopically described. The statistical analysis of data evidenced significant differences between control and treatment groups, which show the teratogenicity and embryotoxicity of the compound used; the treated animals had a high proportion of reabsorptions and embryos with various malformations. The alterations observed are attributable to lead transfer across placenta, as the mothers did not show severe intoxication and embryos are highly susceptible.

**RESUMEN.** En Cuba existen 150 procesos industriales vinculados con el plomo. Además, en los últimos años se revelan mundialmente concentraciones crecientes de plomo en atmósfera, que convierten a los compuestos plomados en contaminantes ambientales. En este trabajo se analiza la acción del nitrato de plomo administrado en ratas gestantes. De cada madre se recogieron los siguientes datos: sitios de implantación, embriones vivos, embriones muertos y reabsorciones. Se describieron macroscópicamente los embriones. El procesamiento estadístico de los datos arrojó diferencias significativas entre los grupos tratados y el control, que muestran la teratogenia y la embriotoxicidad del compuesto utilizado: los animales tratados presentaron una alta proporción de reabsorciones y embriones con diversas malformaciones. Las alteraciones observadas se atribuyen al paso del plomo a través de la placenta, ya que las madres no manifestaron estados de intoxicación severos y que los embriones presentan alta susceptibilidad.

### INTRODUCCION

La importancia del plomo como contaminante industrial y ambiental atrae la atención por la incidencia que pudiera tener en nuestro país, donde hay 150 procesos industriales vinculados con este metal.

La mayoría de las investigaciones relacionadas con este problema se refieren a los efectos directos del plomo sobre el organismo (por ejemplo, el conocido saturnismo), y relativamente pocos estudios tratan sobre los posibles efectos teratogénicos.

Incluso a niveles subtóxicos para la madre, las observaciones clínicas de mujeres en contacto con el plomo muestran desarreglos menstruales, abortos frecuentes, muerte intrauterina y nacidos vivos con anomalías (*Panova, 1972*).

En los estudios que se han hecho con animales, se ha reportado que en el hamster, el plomo produce malformaciones esqueléticas (*Ferm y Carpenter, 1967*); en ganado vacuno, bovino y en conejos no se ha observado respuesta teratológica (*Shupe y cols., 1967; James y cols., 1966; Jessup, 1967*), sin embargo en ratas y ratones hay diversidad de resultados. El propósito de esta investigación es evaluar el potencial teratogénico del plomo en un modelo animal, utilizando ratas de una línea genéticamente estable.

## MATERIALES Y METODOS

Se emplearon ratas Wistar. Se aparearon machos fértiles con hembras vírgenes y al día siguiente se practicó el smear vaginal para determinar si hubo cópula. En casos positivos se designó el día del smear como primer día de preñez. Se separaron las hembras preñadas en jaulas individuales manteniéndoseles con agua y comida ad libitum.

Se hicieron tres grupos experimentales:

- 1º llamado (día 8). Se le suministró el plomo al octavo día de preñez.
- 2º (día 9). Se le suministró el plomo al noveno día de preñez.
- 3º (control). Se le suministró agua destilada al noveno día de preñez.

*Forma de administración del plomo.* Se trabajó con nitrato de plomo — $(NO_3)_2 Pb$  — al 1% en solución acuosa y preparado en el día. La dosis

de 5 ml por kg de peso. Se utilizó la vía intravenosa, a través de la vena safena y bajo ligera anestesia con éter.

A los 16 días de preñez se llevó a cabo la extracción de los embriones mediante una cesárea simple, anestesiando con 45 mg/kg de pentobarbital sódico.

De cada madre se registró el número de sitios de implantación, de embriones vivos, de embriones muertos y de reabsorciones. Se estudió macroscópicamente cada embrión.

#### *Método estadístico para el procesamiento de los datos.*

El número de sitios de implantación se comparó con la prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis.

Las proporciones se compararon mediante el estadístico  $\chi^2$ .

## RESULTADOS

Al no encontrarse diferencia significativa entre los números de sitios de implantación de los tres grupos, se puede relacionar el número de embriones vivos, de embriones muertos y de reabsorciones, con el número de sitios de implantación en cada caso, para efectuar las comparaciones.

La siguiente tabla contiene las proporciones que se analizan a continuación en el texto:

#### *Comportamiento de los parámetros reproductivos:*

Proporción	Control (%)	Día 8 (%)	Día 9 (%)
EV/SI	96.15	57.37	20.15
R/SI	3.84	38.52	70.10
EM/SI	0.00	4.09	6.97

Significado de las abreviaturas: SI: sitios de implantación, EV: embriones vivos, EM: embriones muertos, R: reabsorciones

En las dos primeras proporciones las diferencias son significativas ( $p < 0.01$ ), tanto al comparar los tres grupos simultáneamente, como cuando se comparan dos a dos. La tercera proporción no presenta diferencia significativa.

En general se observa una intensificación del efecto del plomo aplicación al noveno día de preñez, con respecto al octavo día.

Estas proporciones muestran la embriotoxicidad del plomo, que deja sólo la quinta parte de los embriones vivos en el grupo Día 9, y aproximadamente la mitad en el grupo Día 8.

Entre los pocos embriones que quedaron vivos en el grupo Día 9, un 61.53% de ellos presentó al menos una malformación macroscópicamente visible; esta proporción (EV malformado/EV) en el grupo Día 8 fue de un 22.08%, existiendo diferencia significativa entre ambos grupos.

El resto de los embriones vivos no malformados pertenecientes a madres tratadas presentaron atraso en el desarrollo, sin otras deformaciones detectables en el examen macroscópico. Teniendo en cuenta que todos los embriones muertos estaban malformados, y que los restantes sitios de implantación eran reabsorciones, resulta que hay un 100% de afectación en los embriones de los grupos tratados.

Los controles no presentaron ningún embrión muerto ni malformado, y el número de reabsorciones, además de pequeño, fue significativamente diferente con respecto a los grupos "Día 8" y "Día 9".

#### *Descripción macroscópica de los embriones.*

Se encontró que al igual que los teratógenos en general, el plomo no produce un solo tipo de malformación, sino que por el contrario se manifiesta de diversos modos que van desde la deformidad total hasta el simple atraso en el desarrollo.

De las madres tratadas hubo 17 embriones (10 del Día 9 y 7 del Día 8) con malformaciones múltiples, presentando por ejemplo ectopia visceral, gran acortamiento del tórax o abdomen, además de focomelia, siringomelia, alteraciones de la cola, pequeño tamaño corporal, etc. En ge-

neral los cuerpos estaban severamente deformados, y las afectaciones se presentaron combinadas. Siete de estos embriones estaban muertos el día de la cesárea. (Figs. 1-8).

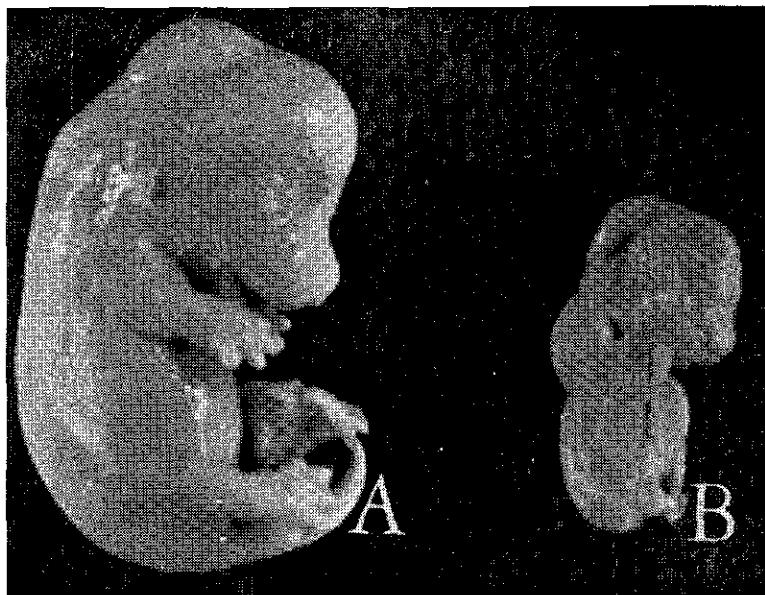


Fig. 1. A: Control; B: Tratado Día 9. Único sobreviviente de su camada. Cuerpo deformé, sirenomelia posterior, y hundimiento craneal.

Otros 28 embriones (16 del Día 9 y 12 del Día 8) presentaron la sirenomalia severa, moderada o leve, acompañada por cola normal, corta o ausente. Estos tipos de afectaciones fueron los más frecuentes. (Figs. 9-11).

Es necesario hacer notar la susceptibilidad diferencial encontrada en este trabajo, ya que dentro de un mismo grupo experimental, se encontraron muchas variantes: unas madres tenían en la camada embriones vivos malformados levemente, otros embriones estaban más severamen-

te alterados, o incluso muertos y algunas reabsorciones; otras madres tenían la camada casi totalmente reabsorbida o por el contrario, todos los embriones con atraso en el desarrollo. (Fig. 12).

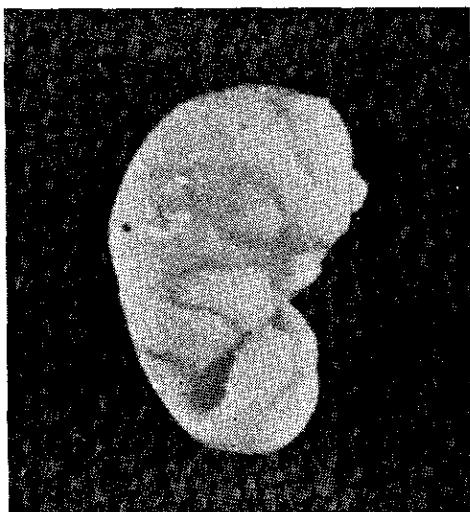


Fig. 2. Tratado Día 9. Muerto, severamente malformado. En su camada había diversos tipos de anomalías.

En los animales que presentaron atraso en el desarrollo, este se evidenció por ejemplo, en el pequeño tamaño corporal y en la no delimitación de las falanges (Fig. 13).

#### DISCUSION Y CONCLUSIONES

La igualdad de los sitios de implantación en los tres grupos, comprobada estadísticamente, se puede explicar debido a que en las ratas la implantación del embrión ocurre del quinto al sexto día de preñez, en tanto que las inyecciones se efectuaron al octavo o el noveno día, o sea, con posterioridad a este evento. Precisamente se escogieron estos días por pertenecer al período de organogénesis intensa.

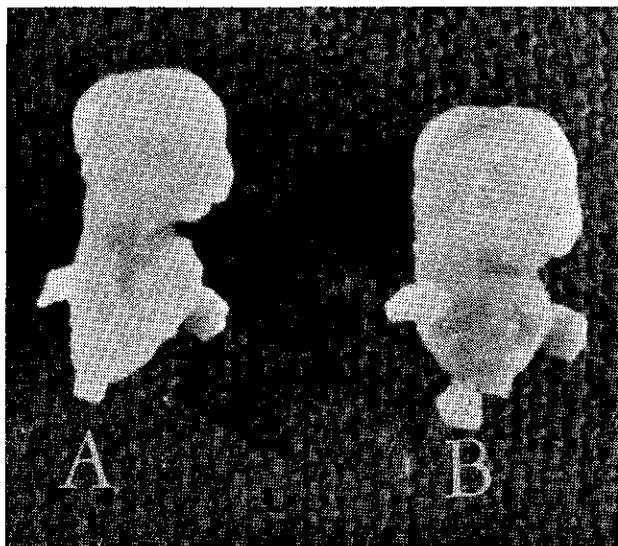


Fig. 3. Tratados Día 9. Apéndice posterior único y ectopia visceral. Falanges no delimitadas.

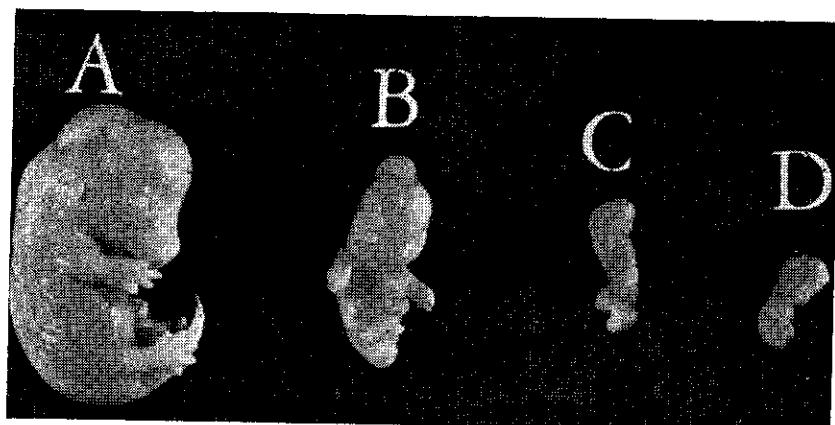


Fig. 4. A: Control; B, C y D: Tratados Día 9. B. Sirenomelia leve y cola normal, único vivo, C. y D. Muertos y totalmente deformes.

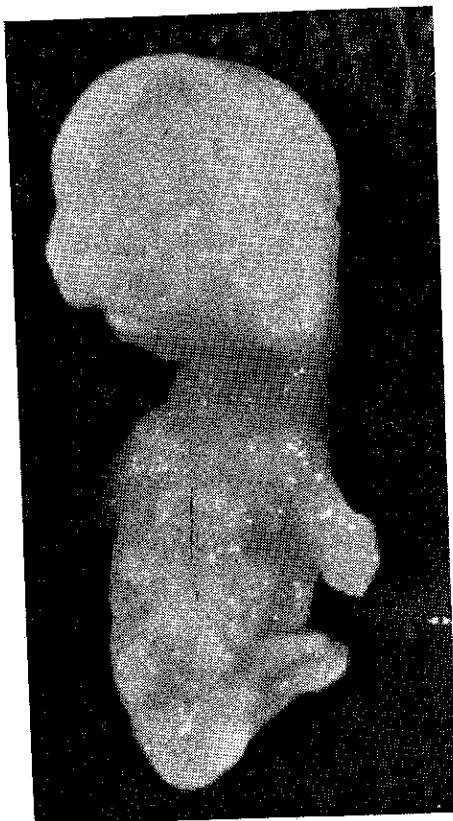


Fig. 5

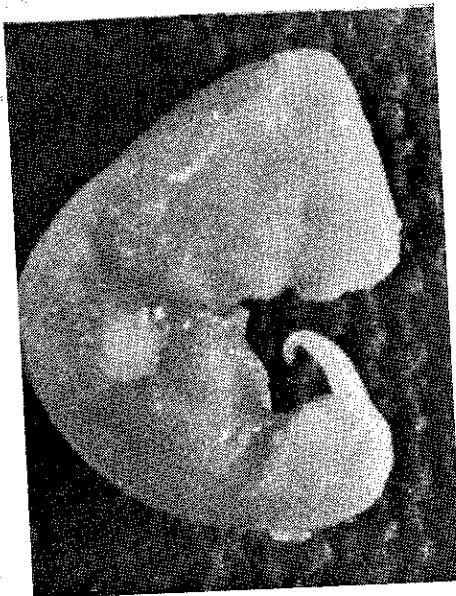


Fig. 6

Fig. 5. Tratado Día 8. Muerto, deformidades severas Ectopia visceral, pata anterior derecha atrofiada, sirenomelia severa y cola corta.

Fig. 6. Tratado Día 8. Muerto. Pertenece a la misma camada que el embrión de la Fig. 5. Muy deformado, las cuatro extremidades están focomélicas.

Se decidió diferenciar los embriones muertos de las reabsorciones para hacer notar aquellos casos en que después de iniciada o incluso avanzada la organogénesis, el agente actúa primero malformado y después llega a hacerse incompatible, con la vida. Es por eso que no interesa en la interpretación de los resultados, la igualdad estadística entre la proporción EM/SI, pues el efecto embriotóxico total, que incluye a los embriones muertos más las reabsorciones, o sea, la proporción inversa a EV/SI, si defiere significativamente.

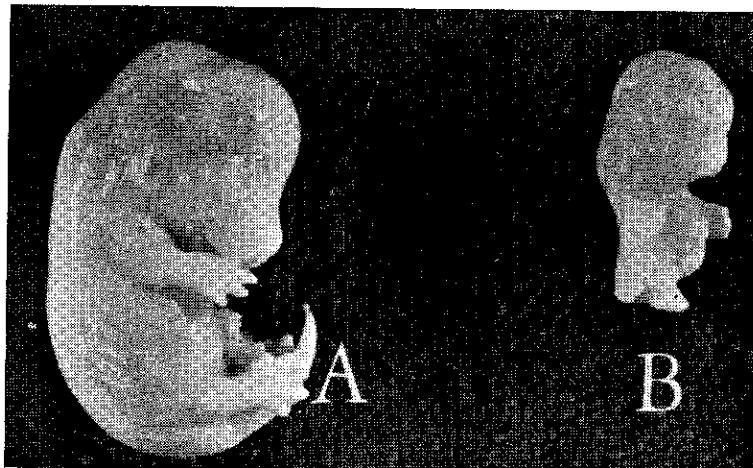


Fig. 7. A: Control; B: Tratado Día 9. Muerto, los restantes sitios de implantación fueron reabsorciones. Véase la atrofia de la cola y extremidades posteriores, así como la no delimitación de las falanges en las extremidades anteriores.

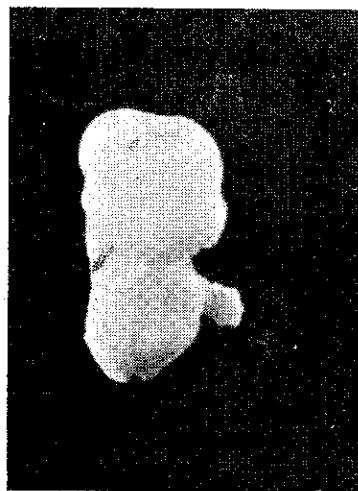


Fig. 8. Tratado Día 8. Vivo, carente de patas y cola. Extremidades anteriores sin falanges delimitadas. En su camada había distintas afectaciones.

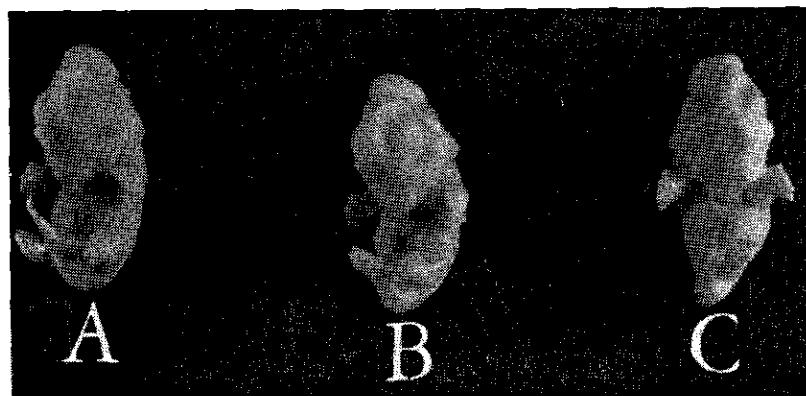


Fig. 9. A, B y C: Tratados Día 8, pertenecen a la misma camada. A: Afectado sólo en atraso en el desarrollo. B: Sirenomelia leve y cola normal. C: Sirenomelia severa y cola normal.

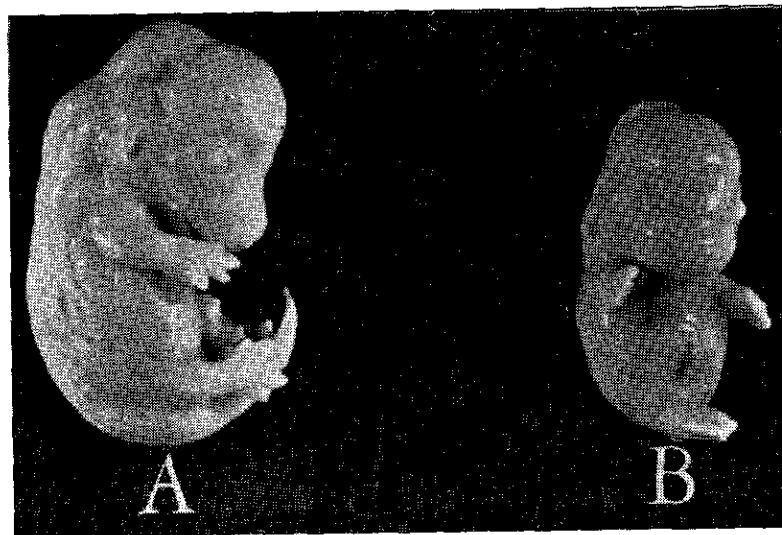


Fig. 10. A: Control; B: Tratado Día 9. Sirenomelia severa y cola ausente. En su camada había varios tipos de sirenomelia.

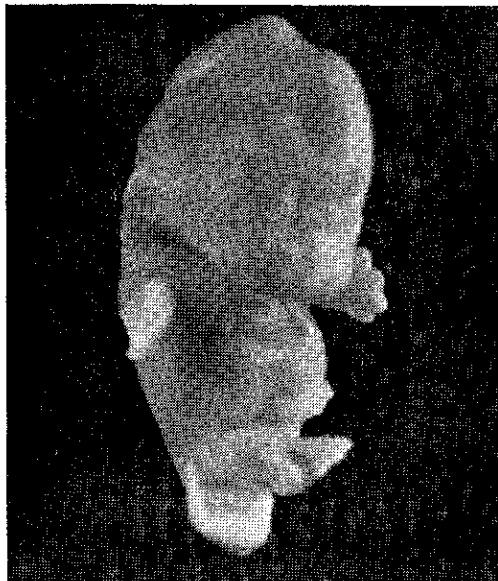


Fig. 11. Es el embrión C de la foto anterior, a mayor aumento.

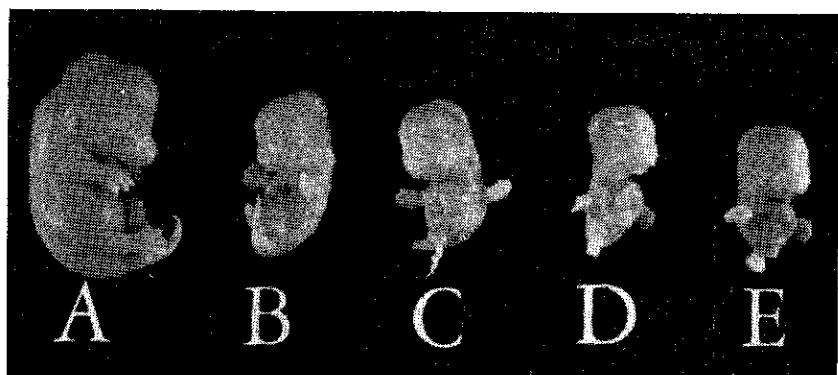


Fig. 12. Susceptibilidad diferencial intra-camada. A: Control; B, C, D y E: Tratados Día 9. B: Sirenomelia leve y cola normal, único vivo de 13 sitios de implantación; C: Apéndice posterior único ladeado; D y E: Apéndice posterior único y ectopia visceral.

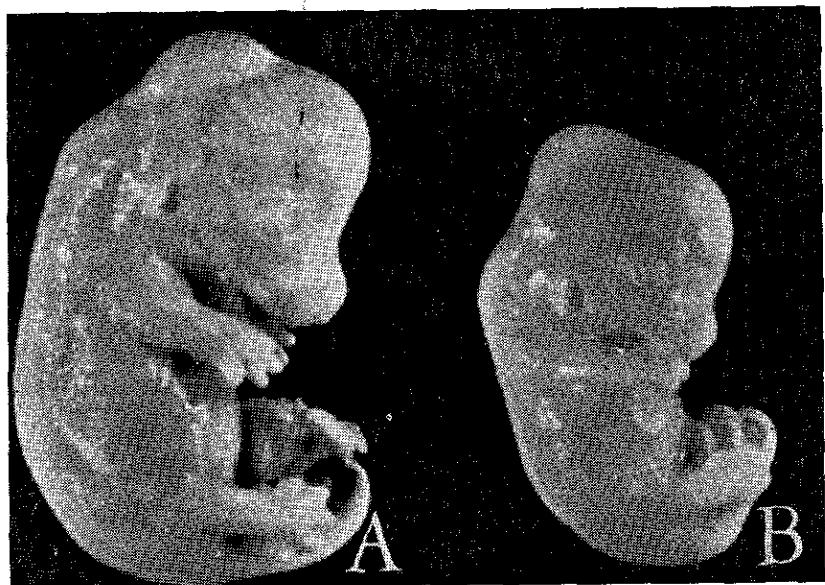


Fig. 13. A: Control; B: Tratado Día 9. Macroscópicamente sólo presenta atraso en el desarrollo. Nótese el pequeño tamaño corporal, así como que las extremidades se presentan cortas y las falanges no están delimitadas.

En el caso de la proporción R/SI, los resultados obtenidos en este trabajo no concuerdan con los de otra investigación realizada en condiciones semejantes (*McClain y Becker, 1975*). Estos autores obtienen para el octavo día un 15% de reabsorciones (sobre 97 SI), y aquí se obtuvo un 38.52% (sobre 122 SI). Para el noveno día la diferencia es aún mayor, ya que ellos reflejan un 20% de R/SI (sobre 133 SI) y en este estudio se encontró un 70.10% (sobre 129 SI). Se pudiera pensar que estas diferencias se deban a las distintas líneas de ratas utilizadas (*Sprague-Dowley y Wistar*), pues se conoce que las variaciones genéticas pueden alterar las respuestas a compuestos extraños por afectación de su absorción, enlace, distribución, bio-transformación, etc. *Nebert y Felton, 1976*.

Las madres pertenecientes a grupos tratados no manifestaron estados de intoxicación severos, como es el caso cuando se trabaja con compuestos organoplomados (*McClain y Becker, 1972*). Al no haber gran depauperio materno, y contando conque los embriones son más suscep-

tibles al plomo que los adultos (*Hubermont y cols., 1976*), se atribuyen las alteraciones observadas al agente utilizado, pues se conoce con seguridad que el plomo atraviesa la barrera placentaria, (*Gershnik, 1974*), y con mayor facilidad cuando está acompañado de un anión inorgánico (*McClain y Becker, 1975*).

Se descarta la posibilidad de que el anión nitrato sea el responsable de los efectos observados, pues existen reportes en la literatura que revelan la toxicidad del plomo en sales de cloro, en acetatos, etc., hecho contrastante con la inocuidad del cloruro de sodio, etc. (*Christensen, 1975; Fischer, 1975*).

Con respecto a las malformaciones observadas, se comprenderá que la diversidad hace difícil suponer un mecanismo de acción único. No obstante hay algunos rasgos bastante comunes en los embriones alterados, como son las afectaciones hacia la parte posterior del cuerpo. Tratando de explicar esta cuestión se señala que aproximadamente hacia el noveno día de preñez en las ratas, el mesodermo axial posterior está en pleno proceso de diferenciación y desarrollo (*McClain y Becker, 1975*); es a partir de ese mesodermo que surgen más tarde o más temprano las estructuras que se ven afectadas en la parte posterior del cuerpo.

Además, se ha sugerido que durante la organogénesis temprana, el plomo, dada su gran afinidad por los grupos sulfhidrilo, pudiera interferir en algún evento enzimático no precisado aún, y que esto trajera como consecuencia los desarreglos posteriores (*Ferm y Ferm, 1971*).

La susceptibilidad diferencial encontrada en este trabajo coincide con las opiniones expresadas por otros investigadores (*Zielhuis, 1975*), sobre lo difícil que resulta establecer una relación dosis-respuesta en el caso de los compuestos plomados.

Por la importancia del tema, y debido a las variaciones que hay entre algunos resultados encontrados en este trabajo y los de otros autores, se concluye que en lo adelante será necesario ahondar en las investigaciones que contribuyan a esclarecer los efectos del plomo sobre el embrión, y los mecanismos de acción correspondientes.

## REFERENCIAS

- CHRISTENSEN G. M. Biochemical effects of methylmercuric chloride, cadmium chloride, and lead nitrato on embryos and alevis of the brook trout. *Salvelinus fontinalis*. *Toxicol. Appl. Pharm.* 32, 191, 1975.
- FERM V. H. AND FERM D. W. The specificity of the teratogenic effects of lead in the golden hamster. *Life Sci.* 10, 35, 1971.
- FERM V. H. AND CARPENTER S. J. Developmental malformations resulting from the administration of lead salts. *Exp. Mol. Path.* 7, 208, 1967.
- FISCHER A. B. The effect of lead on cells cultivated in vitro. I. Acute effects. *Zbl. Bakter. Hyg. J. Abt. Orig B* 161, 26, 1975.
- GERSHANIK J. J., BROOKS G., LITTLE J. A. Blood lead values in pregnant women and their offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 119, 508, 1974.
- HUBERMENT D. C., BUCHET J. P., ROELS H. AND LAUWERYS R. Effect of short term administration of lead to pregnant rats. *Toxicology* 15, 379, 1976.
- JAMES L. F., LAZAR V. A. AND BINNS W. Effect of sublethal doses of certain minerals on pregnant ewes and fetal development. *Am. J. Vet. Res.* 27, 123, 1966.
- JESSUP D. C. Lead Acetate, Teratology Study-Rabbits U.S. Natl. Inf. Service Report. PE-201, 139, 1967.
- MCCAIN R. M. AND BECKER B. A. Effects of organolead compounds on rat embryonic and fetal development. *Toxicol. Appl. Pharm.* 21, 265, 1972.
- MCCAIN R. M. AND BECKER B. A. Teratogenicity, fetal toxicity and placental transfer of lead nitrato in rats. *Toxicol. Appl. Pharm.* 31, 72, 1975.
- NEVERT D. W. AND FELTON J. S. Importance of genetic factors influencing the metabolism of foreign compounds. *Fed. Proc.* 35, 1133, 1976.
- PANOVA Z. Early changes in the averian function of women occupational contact with inorganic lead. Works of the United Research Institute of Hygiene and Industrial Safety vol. 23, 161, 1972.
- SHUPE J. L., BINNS W., JAMES L. F. AND KEERLER R. F. Lupine, a cause of cracked calf disease. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 151, 198, 1967.
- ZIELHINS R. L. Dose-response relationships for inorganic lead II. Subjective and functional responses —Chronic sequelae —No response levels. *Int. Arch. Occup. Health.* 35, 19, 1975.