
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ACIDO
DELTA-AMINOLEVULINICO DESHIDRATASA EN TRABAJADORES
LABORALMENTE EXPUESTOS AL PLOMO.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
CLAUDIO PRECIADO CUEVA

GUADALAJARA, JAL.,

1989

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ACIDO DELTA-
AMINOLEVULINICO DESHIDRATASA EN TRABAJADORES LABORALMENTE EXPUESTOS
AL PLOMO

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por su digno ejemplo de apoyo, fidelidad, libertad, responsabilidad y valor en el conducirme de la vida.

A quienes que con su filosofía y compañía, han enriquecido mi razón de existir.

A aquellas personas que con su quehacer científico nos enseñan a convivir con la naturaleza.

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD de GUADALAJARA; Por permitirme ser parte de su historia.

A la FACULTAD de CIENCIAS; Por que en ella aprendí lo que es el quehacer científico.

A la UNIDAD de INVESTIGACION BIOMEDICA de OCCIDENTE del I.M.S.S.; Por las facilidades prestadas para la realización de este estudio.

A la CLINICA-HOSPITAL 46 del I.M.S.S.; Por su ayuda en el desarrollo de esta tesis.

Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega; Por su inapreciable enseñanza, su talento honesto y su sincera amistad.

Sr. Amado Gueraña Burgos; Por su valiosa cooperación en la realización de este trabajo.

Med. Luz Mariá Cueto; Por su ayuda en el desarrollo en la presente tesis.

Biol. Jalil Fallad Chavez; Por desinteresada ayuda en la redacción, edición del texto y gráficas.

Ing. Rogelio Troyo Sanroman; Por su ayuda en el análisis estadístico de los datos obtenidos en el presente trabajo.

A la Laboratorista María del Refugio Gómez Sánchez y a la Q.F.B. María Guadalupe Cruz López; Por su ayuda en la cuantificación de las muestras.

A mis maestros; Que con su entrega y enseñanza, fueron mis guías ideológicos de mi deber como biólogo ante la sociedad.

INDICE

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
JUSTIFICACION	23
OBJETIVOS	25
HIPOTESIS	26
MATERIAL Y METODO	27
ANEXO	36
RESULTADOS	38
DISCUSION	51
CONCLUSIONES	56
LITERATURA CITADA	58

INTRODUCCION

La intoxicación por plomo ocupa el primer lugar en México en lo que respecta a los problemas de intoxicación laboral (1). Este problema se presenta principalmente entre los trabajadores de fábricas de acumuladores, fábricas de pinturas, fábricas de balas y municiones y en artesanos que laboran la loza de barro vidriada (2,3,4).

El plomo es capaz de causar daños al ser humano y al medio ambiente, ya que por la diversidad de sus aplicaciones, es de esperarse que se encuentre como contaminante tanto en las áreas rurales y urbanas. Las concentraciones plasmáticas relativamente pequeñas del metal en forma iónica pueden producir un envenenamiento o intoxicación por plomo, conocida como SATURNISMO o PLUMBISMO. El plomo se encuentra distribuido ampliamente en la corteza terrestre y en mayor cantidad en los estratos profundos, donde se encuentran mantos freáticos, debido a lo cual el metal es captado por la raíz de las plantas y las especies animales lo incorporan al ingerir las plantas; lo que explica la presencia de plomo en los seres vivos, animales o vegetales; sin embargo, ninguna función biológica ha sido ligada al plomo (5).

El daño bioquímico por plomo en la biosíntesis del Heme es el campo más explorado en los estudios de intoxicación plúmbica. Los efectos inhibitorios se presentan a varios niveles y con manifestaciones muy diversas a corto o largo plazo, pero de manera

general se puede decir que provocan una deficiente hemoglobinización, constitución, vida media y producción de eritrocitos; otros estudios neurológicos, fisiológicos y genéticos entre otros, confirman lo anteriormente mencionado.

A nivel enzimático, aquellas enzimas que intervienen en la biosíntesis del grupo Heme, con la consecuente acumulación de los substratos correspondientes, es donde se observa una de las manifestaciones más temprana de la intoxicación por el plomo y aparecen cuando todavía no hay síntomas. En la actualidad se realiza el diagnóstico y la evaluación de los efectos de la terapia que se maneje, así como el establecimiento de la curación química de los pacientes con cualquier tipo de intoxicación por plomo, mediante los estudios enzimáticos (6).

ANTECEDENTES

El plomo es una metal que ya era conocido desde los inicios de la civilización euroasiática del siglo XV a.C. Los Egipcios lo recibían como tributo de Mesopotamia y lo usaban para elaborar algunos utensilios de cocina y cosméticos. Durante el Imperio Romano el plomo adquirió un papel muy importante en la tecnología y fue utilizado en el recubrimiento de acueductos, en la fabricación de tuberías para las redes de agua, en la elaboración de utensilios de cocina y de recipientes para vinos. Es muy probable que estos usos contaminaran en forma considerable los alimentos y el agua. A la caída del Imperio Romano en el siglo V, el uso del plomo disminuyó durante cerca de 600 años. Después en el siglo XI empezó a ser extraído nuevamente de las minas Alemanas, para ser usado en la preservación del vino por medio de la adición de este. En el siglo XVIII Baker elaboró una lista de padecimientos patológicos de carácter endémico debido al plomo (7). Mc. Cord hablaba de una alta frecuencia de cólicos saturninicos en la América Colonial debido a que la destilación del ron se hacía en equipos que contenían plomo y el uso de utensilios de barro mal vidriado que contenían gran cantidad de litargirio (monóxido de plomo, PbO). Con la aparición de los motores de combustión interna a partir de fines del siglo XIX, se adiciona otro agente en el problema de la contaminación por plomo, ya que su uso como antidetonante en las gasolinas incrementó de forma importante el riesgo de contaminación general (2).

Actualmente el plomo se utiliza en la manufactura de diversos

productos; siendo la fabricación de acumuladores eléctricos la más importante en términos de cantidad de plomo empleado en ellos (8). También se utilizan en la composición de productos tales como gasolina, cerámica, cristal, colorantes, pinturas y soldaduras, entre otros. Todos los compuestos previamente enlistados son tóxicos en diverso grado tanto en animales como en vegetales. Aproximadamente 45% de la producción total de plomo es utilizada en la industria de acumuladores, el 10% en la producción de compuestos orgánicos en particular en el tetraetilo y tetrametilo de plomo, que se adiciona a las gasolinas como antidetonantes) y el 45% restante tiene múltiples aplicaciones: en el uso de soldadura, en la elaboración de cables, municiones, pigmentos, tipos de imprenta, láminas de revestimiento, de blindaje y esmaltes especiales (2).

ASPECTOS TOXICOLÓGICOS. La intoxicación por plomo es una de las enfermedades de carácter ocupacional más antiguas según los antecedentes históricos lo cual dió origen a la llamadas enfermedades profesionales. A través de los años se han usado métodos diversos para detectar la presencia de plomo en el organismo. Hasta el año de 1927 el método principal que se utilizaba consistía en una pesquisa clínica que se efectuaba cada mes y que incluía la detección temprana de síntomas de intoxicación por plomo. A partir de ese año, en 1937 Klima y Seyfried consideraban de gran valor en el diagnóstico del saturnismo la aparición de cierto número de eritrocitos que presentaban un punteado basófilo (fenómeno que se observa cuando se tifen los frotis sanguíneos con un colorante a base de azul de metileno) (9). El recuento del punteado basófilo se apoyaba con determinaciones de hemoglobina. Este era prácticamente el único

análisis de laboratorio en el que confiaban la mayoría de los médicos, aunque dicho signo no era exclusivo del saturnismo. A pesar de ello, estas medidas de control en los trabajadores expuestos al plomo persistieron hasta 1962, año en que se iniciaran regularmente las determinaciones de plomo en la orina (10). En la actualidad, se dispone de pruebas analíticas cuantitativas muy precisas para la determinación de plomo tanto en la sangre como en la orina. Estas cuantificaciones junto con los métodos de medición de algunos efectos bioquímicos causados por el metal en la biosíntesis del grupo Heme, hacen más firmes las bases para diagnosticar una intoxicación por plomo, aunque los más preferidos son aquellos que utilizan la espectroscopia clásica de Absorción Atómica con flama (11).

Otro método que era utilizado para este efecto era el de extracción con Ditiizona para la determinación de plomo, ya sea por colorimetría o estimación indirecta por titulación: es un procedimiento que ha tenido aceptación en el pasado y que aún sigue en uso debido a su efectividad. Este método está basado en la formación de un complejo plomo-ditiizona que toma un color rojo, el cual es soluble en cloroformo o tetracloruro de carbono. Se han elaborado numerosos procedimientos específicos basados en la determinación espectrofotométrica del ditiizano de plomo, para lo cual se usa relativamente grandes cantidades de reactivos para determinar cantidades de plomo del orden de microgramos, si bien el problema de contaminación por plomo en los reactivos está presente siempre. A pesar de que se dice de que resultaban precisos, son métodos muy tardados y tediosos, pero con ello se dió inicio a las determinaciones por medio de análisis colorimétrico (10).

La determinación de la intoxicación por plomo en las personas se puede establecer mediante el examen clínico de pacientes y por medio de pruebas de laboratorio. En el primer caso, los síntomas que presenta el paciente son semejantes a los de una persona con anemia aguda, mareos, astenia, adinamia, anorexia, dolor abdominal y estreñimiento (12). Las manifestaciones externas de ellos son oscurecimiento de la encía a nivel de la base de los dientes (reborde gingivodentario) llamado Signo de Burton (8). Todo esto producto de la forma particular de la intoxicación por plomo, el cual inicialmente llega a la sangre, se fija en el eritrocito y se distribuye en todos los órganos del cuerpo, fijándose en los huesos largos en los adultos, pelo y dientes, disminuyendo la producción de hemoglobina y ocasionando con este efecto la acumulación de los metabolitos precursores de la síntesis del Heme. En adolescentes y niños, la fijación del plomo es menor y aumenta la posibilidad del movimiento de éste metal a cerebro y a otros tejidos nerviosos (13-20).

En los laboratorios de toxicología se ha establecido un juego de determinaciones para el diagnóstico real de intoxicación por plomo: Plomo en Sangre (Pb-S), ácido delta-aminolevulinico en Orina (ALA-U), Protoporfirina Eritrocítica IX, Porfobilinógeno y en algunos estudios se recomienda que solo las determinaciones de ALA-U y el Pb-S sean las definitivas para poner de manifiesto dicha intoxicación (10). El diagnóstico de la intoxicación plúmbica mediante pruebas de laboratorio, puede hacerse a través de dos formas: Una DIRECTA: que determina la concentración de plomo en líquidos y secreciones tales como; sangre y orina generalmente por el método de espectrofotometría

de Absorción Atómica y las INDIRECTAS; mediante la determinación de los principales metabolitos que se acumulan al bloquearse la síntesis de la hemoglobina por la acción del plomo en sangre, siendo los principales metabolitos que se acumulan Protoporfirina Eritrocítica IX, Porfobilinogeno y ALA-U (21,22). En los procesos productivos de numerosas industrias como la de la fabricación de acumuladores, los trabajadores se encuentran expuestos a compuestos inorgánicos de éste metal, predominantemente bajo la forma de humos y polvos, de manera que la principal VIA DE INGRESO de éste elemento al organismo es por VIA RESPIRATORIA mediante la inhalación de partículas de plomo suspendidas en el aire. Otro medio de ingreso adicional de plomo es por la VIA GASTROINTESTINAL ocurre en los trabajadores con hábitos higiénicos deficientes y que acostumbran fumar e ingerir alimentos en las áreas de producción. En el caso de los compuestos orgánicos derivados del plomo (tetraetilo y otros derivados alquílicos), la absorción por VIA CUTANEA puede ser significativa (8). A partir de su difusión al sistema capilar y de su distribución sanguínea, los cationes divalentes de plomo se unen en su mayor parte a moléculas que intervienen en distintos ciclos metabólicos, produciendo así principalmente la alteración de la biosíntesis del heme que conduce a la disminución en la síntesis de hemoglobina, citocromos, catalasas y peroxidasas, entre otras; además de que una fracción mínima establece enlace con las proteínas del plasma y la difusión de iones de plomo al espacio extravascular permite su acceso al interior de las células. El plomo se almacena principalmente en el tejido óseo donde se fija temporalmente en forma de compuestos biológicamente inertes y en proporciones reducidas se deposita en otros órganos o tejidos blandos como lo son riñon, hígado y en forma secundaria en el Sistema Nervioso Central donde se acumula en la substancia gris, en

particular en los ganglios basales, acumulándose también en grandes cantidades en el sistema muscular (7). El metal es almacenado a largo plazo en el pelo, los huesos y los dientes en donde tiene un ciclo de renovación de aproximadamente 10 años (7,23). Así mismo, las principales vías de eliminación del plomo contenido en el organismo son las heces y la orina (8). Los efectos tóxicos del plomo se derivan fundamentalmente de su propiedad de interferir en diversas funciones celulares mediante la inhibición de procesos enzimáticos. La intoxicación plúmbica se clasifica en AGUDA o CRÓNICA de acuerdo con el tiempo en que aparecen las manifestaciones clínicas y la duración de la exposición. La intoxicación plúmbica AGUDA se presenta por ingestión de una dosis única excesivamente grande de sales de plomo. La intoxicación plúmbica CRÓNICA ocurre por la exposición repetida a dosis bajas de compuestos inorgánicos de plomo, generalmente durante tiempo prolongado (23). En el adulto la intoxicación crónica se observa principalmente en trabajadores expuestos a plomo y humos de compuestos inorgánicos de plomo, en particular en los que trabajan en áreas de producción de acumuladores automotrices, fundición y refinado para la obtención de óxidos de plomo (8). La exposición crónica a compuestos inorgánicos de plomo ocasiona un incremento paulatino de la concentración del metal en el organismo, de acuerdo a la dosis tal incremento origina efectos adversos en múltiples mecanismos biológicos, los cuales por ser indeseables, se denominan efectos tóxicos independientemente de su extensión o gravedad. En consecuencia algunos autores consideran que la intoxicación plúmbica crónica puede ser metabólica o clínica, sean evidentes las alteraciones bioquímicas exclusivamente o existan además manifestaciones clínicas (23). Otro aspecto relacionado con

los conceptos anteriores y que ha causado polémica internacional es el referente a la intoxicación plúmbica SUBCLINICA, misma que se define como la causa de morbilidad y/o mortalidad por exposición al plomo sin aparición de los signos y síntomas típicos de la intoxicación plúmbica clínica, ya que la exposición ambiental a bajas concentraciones de plomo se asocia con otras enfermedades, en particular con alteraciones en el desarrollo psicomotor de la población infantil (23). En el caso de la intoxicación plúmbica crónica del adulto los efectos biológicos más importantes ocurren en los órganos hematopoyéticos durante la síntesis sanguínea y en el sistema nervioso periférico. Se sabe que el plomo, por unión química covalente actúa como inhibidor irreversible de numerosas enzimas, algunas involucradas específicamente en la síntesis del grupo Heme (24). En el sistema nervioso periférico el plomo produce desmielización segmentaria, aunque hasta el momento no se ha establecido, con precisión, el mecanismo exacto por el cual se produce dicho fenómeno (23).

El plomo inhibe principalmente dos enzimas de la ruta biosintética del grupo Heme: a) la DESHIDRATASA DEL ACIDO DELTA-AMINOLEVULINICO (ALA-D). La síntesis del ácido delta-aminolevulinico (ALA) en Porphobilinógeno, que se ve interferida por la inhibición de la deshidratasa del ALA. b) La FERROQUELATASA o HEMOSINTETASA. La incorporación del hierro a la Protoporfirina IX, debido a la inhibición de la ferroquelatasa. La inhibición de la primera, trae como consecuencia la acumulación de su substrato, el ácido delta-aminolevulinico (ALA), primero en el espacio extra-celular y posteriormente en su vía de excreción que es la orina (ALA-U). La inhibición de la segunda enzima trae como consecuencia la

incorporación de un átomo de zinc en la Protoporfirina en lugar de un átomo de hierro produciendo la acumulación de Protoporfirina-zinc (PPZ) en el eritrocito (24).

ENZIMAS

Las células pueden actuar como maquinarias químicas por que poseen ENZIMAS, que son catalizadores capaces de aumentar mucho la velocidad de reacciones químicas específicas (25). Las enzimas son moléculas proteínicas muy especializadas, elaboradas por las células a partir de aminoácidos. Cada enzima puede catalizar un tipo específico de reacción química. Una propiedad especialmente notable de las reacciones químicas en las células vivas son las reacciones catalizadas enzimáticamente y tienen lugar con un rendimiento del 100%. Debido a que las enzimas pueden acelerar una sola transformación de una molécula determinada, sin inducir ninguna otra posible reacción, los seres vivos pueden llevar a cabo de modo simultáneo, muchas reacciones individuales diferentes. Las moléculas enzimáticas se combinan con sus substratos durante el ciclo catalítico, de tal modo que el centro activo de la molécula de la enzima se adaptara al substrato con una complementaridad estructural casi perfecta, esto es debido a la especificidad de muchos de los diferentes tipos de interacciones moleculares en las células. Los centenares de reacciones químicas, catalizadas enzimáticamente que tienen lugar en la célula no se realizan de modo independiente unas de otras, sino que, por el contrario están relacionadas entre si y constituyen muchas secuencias diferentes de reacciones consecutivas que posean intermediarios comunes, de modo que el producto de la primera reacción se convierte en el substrato o reactante de la

segunda y así sucesivamente, la consecuencia biológica de este efecto es que tales sistemas de reacciones eslabonadas determinan que las reacciones químicas se canalicen por rutas específicas y otra es que las reacciones secuenciales hacen posible la transferencia de energía química entre dos reacciones en condiciones de presión y temperatura constantes, realizándose solamente en presencia de un intermediario común. Por otra parte la conexión entre las reacciones consecutivas enzimáticas permite la regulación del metabolismo y le da la capacidad para auto-ajustarse. La acumulación de un producto final del metabolismo puede inhibir la etapa determinante de la velocidad en la secuencia de reacciones mediante las cuales se formó, tipo de control conocido como Inhibición "Feed-Back". Las células son capaces de regular sus reacciones metabólicas y las biosíntesis de sus enzimas para obtener el máximo de eficiencia y de economía. Las enzimas se clasifican basándose en la reacción que catalizan. Algunas enzimas son proteínas simples, otras son proteínas conjugadas y contienen grupos prostéticos constituidos por iones metálicos, por coenzimas (moléculas orgánicas) o por ambos. Las Coenzimas y grupos prostéticos actúan como transportadores intermediarios de grupos funcionales específicos, de átomos o de electrones. En las reacciones catalizadas por enzimas, un incremento de la concentración del sustrato aumenta la velocidad de las reacciones hasta que se alcanza un punto en que dicha velocidad se hace independiente de la concentración del sustrato. En este punto la enzima está saturada y la reacción es conocida como de orden CERO con respecto al sustrato. Para cada enzima hay una concentración de sustrato (K_m , de la constante de Michaelis-Menten) característica a la que la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. La relación

cuantitativa entre velocidad inicial de la reacción y la concentración del sustrato (K_m) y la velocidad máxima de una enzima vienen dadas por la ecuación de Michaelis-Menten, basándose en la suposición de que se forma un complejo enzima-sustrato que es reversible, como etapa esencial de la catálisis. Las enzimas tienen un pH óptimo y un intervalo de temperatura en el que son estables y activas. Las reacciones catalizadas por las enzimas son de 10 a la 8 a 10 a la 20 veces más rápidas que las correspondientes reacciones no catalizadas por éstas. Una parte principal del incremento de la velocidad depende probablemente de la colocación exacta del sustrato en cuanto a la orientación y la proximidad al grupo catalítico, de modo que se alcance con facilidad el estado de Transición (del complejo Enzima-Sustrato (ES), para formar el Producto (P)). El aumento de velocidad es posible también mediante la catálisis ácido-base promovida por los grupos dadores o aceptores de protones situados en el centro activo. La velocidad experimenta también un incremento debido a los cambios de conformación que se producen cuando se combinan la enzima y el sustrato. Algunas enzimas están biológicamente adaptadas para desempeñar una función catalítica además de una reguladora, ya que poseen múltiples subunidades, cada una específica ya sea una u otra actividad anteriormente mencionadas, estas enzimas son llamadas Alostéricas, las cuales catalizan la primera reacción de una secuencia multienzimática y con frecuencia son inhibidas por el producto final de la secuencia que se une a un centro regulador específico o alostérico de la molécula enzimática. Algunas enzimas aparecen en formas múltiples llamadas Isoenzimas, dentro de una especie determinada o tipo de célula. Contienen diferentes proporciones de dos o más tipos de cadenas polipeptídicas lo que determina que las formas isoenzimicas difieran en K_m o $V_{máx}$.

INHIBIDORES ENZIMATICOS: Los inhibidores **COMPETITIVOS** de las enzimas son aquellos que reaccionan reversiblemente con la enzima libre en competencia con el sustrato para formar un complejo enzima-inhibidor, su acción puede invertirse por incremento de la concentración del sustrato. Los inhibidores **ACOMPETITIVOS** no reaccionan con la enzima libre pero se combinan reversiblemente con el complejo enzima-sustrato, impidiendo la formación de los productos. Los inhibidores **NO COMPETITIVOS** reaccionan reversiblemente tanto con la enzima libre como con el complejo enzima-sustrato. Los inhibidores reversibles producen una modificación química permanente de algún grupo funcional esencial en la molécula de la enzima. Los aspectos cinéticos se utilizan para distinguir entre los diversos tipos de inhibición reversible de las enzimas. En las reacciones bisustrato de desplazamiento simple **AL AZAR**, la enzima forma un complejo ternario con ambos sustratos, los cuales pueden adicionarse en cualquier orden. En las reacciones de desplazamiento simple **ORDENADAS** existe una secuencia obligatoria en la adición de los sustratos para formar el complejo ternario. En las reacciones de doble desplazamiento o ping-pong, un sustrato reacciona con la enzima y su correspondiente producto se libera antes de que se combine el otro sustrato. Los estudios en enzimas se efectúan normalmente midiendo la velocidad inicial de la reacción bajo condiciones en las que la enzima esté saturada con el sustrato y el pH es óptimo. La existencia de complejos enzima-sustratos y de complejos covalentes, se ha deducido de estudios cinéticos de experiencias de captación y de mediciones espectrofotométricas. La topografía del centro activo de las enzimas es estudiada mediante la determinación de la especificidad de sustratos, utilizando reactivos químicos

especificos capaces de modificar covalentemente los grupos funcionales esenciales para la catálisis, por marcaje de afinidad y mediante análisis por rayos X de los complejos cristalizados enzima-substrato o enzima-inhibidor. Los grupos R de la Serina, la Histidina, la Lisina y la Cisteina, presentes en las proteínas enzimáticas intervienen frecuentemente en la catalisis en el centro activo.

CARACTERIZACION DE LA ENZIMA ACIDO DELTA-AMINOLEVULINICO DESHIDRATASA (ALA-D).

La ácido delta-aminolevulinico deshidrastasa (Porfobilinógeno Sintetasa, (clasificada como EC.4.2.1.24) cataliza la conversión del ácido delta-aminolevulinico hacia Porfobilinógeno, que es un precursor monopirrólico en la síntesis del Heme, Clorofilas y Corrinas (Battersby y Mc Donald, 1975; Akhtar y Jordan, 1978). La enzima primero fue aislada y purificada de Hígado de Bovino por Gibson y Col. en 1955, desde entonces hasta la actualidad ha sido investigada para su caracterización, desde un amplio enfoque (26,27).

PURIFICACION DE ALA-D DE ERITROCITOS HUMANOS.

Philip N. Gibbs en 1985 desarrolló una técnica de laboratorio para la purificación de ALA-D, basándose en estudios anteriores de Shemin 1972, Tomokuni 1975, entre otros, aventajandolos en que mediante una columna de separación DEAE-BIO-GEL pudo retirar la hemoglobina de cualquier proteína eritrocítica, ya que interfería en la cuantificación de ALA-D en cuanto al punto isoeléctrico ácido y la sensibilidad de ésta al oxígeno, todos los procedimientos llevados

a cabo en Buffers conteniendo Tioles, que son hidrocarburos en los que el hidrógeno ha sido reemplazado por un grupo -SH (por ejemplo CH₄-SH, metanotiol), también se les conoce como mercaptanos (los tioles reaccionan entre sí para dar los grupos disulfuros). Tioles como el 2-mercaptoetanol o ditioeritritol a 4 grados C. La enzima ALA-D se desnaturaliza a 50 grados C y mediante este método se obtuvo una actividad específica final de 24.0 unidades/mg cuando fue probada en presencia de Zinc +2 y 18.8 unidades/mg., en la ausencia de este metal, esta actividad es la más alta hasta ahora reportada, este método tiene una aplicación general en la purificación de otras enzimas eritrocíticas. La pureza de la enzima se ha comprobado mediante electroforesis en gel-poliacrilamida.

PROPIEDADES MOLECULARES DE ALA-D

El peso molecular de la enzima ALA-D ha sido determinado por varios grupos de investigadores (Despaux y col. en 1979; Sassa y Cappas en 1983, Gibbs y col. en 1985), mediante columna de filtración Bio-Gel determinaron un Peso Molecular de $285,000 \pm 10,000$ D., encontrando que esta enzima se conforma de subunidades de peso molecular de 35,000 D. Por difracción de rayos X y estudios cristalográficos se descubrió que en Mamíferos esta enzima presenta una naturaleza Octamétrica, está compuesta aparentemente de Ocho subunidades idénticas en una estructura cúbica octagonal con simetría Diedrica (D₄), mediante el uso de Microscopía electrónica se ha determinado la estructura cuaternaria de la enzima nativa (semipurificada). La enzima ALA-D presenta un punto isoeléctrico de 4.85 ± 0.20 (4.9).

El pH óptimo de la enzima se encuentra sobre un rango de 5.6 a 7.7, pero la máxima actividad de la enzima la realiza a un pH = 6.8. La K_m para ALA-D es de 287 ± 31 mM a un pH óptimo de 6.8. Se ha descubierto que, de las dos moléculas de ácido delta-aminolevulinico que son ligadas en el sitio activo enzimático, la primera está unida a la enzima con una alta afinidad comparada con la segunda, lo cual se definió como la existencia de un doble plano-recíproco ya que en un rango de sustrato de 50 mM a 5 mM, no se ha observado la presencia de más de un sustrato. Sobre este efecto se ha explicado al observarlo prolongadamente refleja una constante disociación de la segunda molécula de sustrato. El centro de la actividad catalítica de la enzima es de 14 mol. de Porfobilinógeno producidos por minuto a 37 grados C por subunidad de enzima, asumiendo que todas las subunidades son viables catalíticamente y basadas en una actividad específica de 24 unidades/mg. Histidina, arginina y principalmente lysina, se encuentran en el sitio activo de la enzima ALA-D, interviniendo en la formación del enlace covalente con el sustrato ALA (39).

REQUERIMIENTO DE ZINC⁺² COMO COFACTOR ENZIMATICO.

La ALA-D en común con todas las deshidratasas de Mamíferos requiere la presencia de Zinc⁺² (Tsukamoto y Col. 1979, Bevan y col. 1980) para su máxima actividad catalítica. La dependencia de este ion para la actividad catalítica de la ALA-D Humana fue investigada probando la Apoenzima incubada con EDTA, siguiendo una filtración en Gel en buffers libres de Zinc (Zn), los resultados mostraron que la

Apoenzima tenía una baja actividad en relación al control, sin embargo cuando se probó en presencia de Ditioneitol, la actividad resultante fue atribuida a la presencia de cantidades de zinc, presentes en el Ditioneitol, las cuales podían ser detectadas por espectroscopia de Absorción Atómica. La máxima estimulación ocurre al adicionar en un rango de 100 a 300 mM de zinc⁺² obtenido por Meredith y col. en 1977; Davis y Abrahams en 1980, Trevisan y col. en 1980, Geisse en 1983; Gibbs y col. en 1985). La concentración de zinc en toda la sangre es de 135 ±31 mM (Vallae y Gibson 1948) y 109 ±29 mM (Meredith y Moore en 1980) cayendo dentro del rango antes mostrado, esto sugiere que la enzima humana es completamente activa "in vivo". También se ha observado en pruebas de laboratorio que la baja actividad específica de la enzima nativa en ausencia de Zinc fue encontrada debido a que parece ser que desciende en V_{máx} (velocidad máxima de la reacción, enzima-substrato) en vez de la concentración del substrato (K_{m.app}) (28).

REQUERIMIENTO DE GRUPOS TIOLIS DE LA ENZIMA ALA-D.

Una característica común de todas las deshidratasas es su marcada sensibilidad al oxígeno. Esta sensibilidad está asociada con la presencia de Cisteína reducida altamente reactiva, la cual es requerida para mantener tanto la actividad como su estabilidad (Tsukamoto y col. 1979; Barnard 1977; Seehra y col. 1981). Estos grupos pueden mantenerse en su estado reducido por la presencia de una alta concentración de un tiol activado (Shemin 1976) tal como es el 2-mercaptoetanol, ditioneitol o Ditioneitol. Otros aminoácidos han mostrado un papel importante en la actividad de la deshidratasa

del ALA en Bovinos, siendo los más significantes la Histidina (Tsukamoto 1975) y Lisina (Nandi, 1978). Al igual que otras deshidratasas de Mamíferos, la ALA-D Humana presenta una sensibilidad a la oxidación (Shemin 1972; Cheh y Neilands, 1976). Experimentalmente, la enzima desactivada por la presencia de oxígeno, ha sido restablecida en su actividad mediante incubaciones con tioles como el Ditiogeritritol en bajas concentraciones para mantener completamente la actividad catalítica de la enzima. Otros estudios indican que existe una relación entre el Zinc y la sensibilidad de los grupos tioles, ya que cuando la apoenzima fue expuesta al aire, hubo una inactivación a un tiempo dado, la que fue casi completamente evitada por la presencia del Zinc ⁺² y en la Holoenzima la sensibilidad de los grupos tioles se ha observado que no es duradera en reacciones prolongadas, así es como se establece que los iones de zinc ayudan a mantener a los grupos tioles en estado reducido, con esto permitiendo la máxima actividad de la enzima ALA-D.

INHIBICION E INACTIVACION DE LA ENZIMA ALA-D.

Los efectos de varios inhibidores y agentes inactivadores de la ALA-D de mamíferos han sido determinados y descritos por varios autores. Principalmente el EDTA causa una inactivación en un tiempo-dependiente debido a este agente quelante (Gibson y col. 1955). Concentraciones de Zinc ⁺² en la enzima: En ausencia de este puede disminuir la actividad enzimática en un 88%. También ha sido observada una inactivación en la enzima ALA-D en presencia de un reactivo tiofilico, el 5,5'Ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) debido a la modificación de grupos importantes catalíticamente de Tioles. Acetonas incluyendo el ácido 3-Clorolevulinico y el inhibidor directo

del sitio activo el ácido 5-Clorolevulinico (Seehra y Jordan 1981) producen una inactivación de manera lineal. Por otra parte el Etanol y algunos metales pesados como el mercurio a altas concentraciones causan disminución en la actividad de ALA-D.

EFEECTO DEL PLOMO SOBRE LA ENZIMA ALA-D.

El plomo es un potente inhibidor NO Competitivo en la actividad de la ALA-D, afectando la actividad de la enzima, tanto en su K_m (concentración del sustrato) como la velocidad de reacción ($V_{máx}$), indicando con esto que el plomo interfiere con la enzima libre aproximadamente 3 veces más fácilmente que con el complejo Enzima-Sustrato. El efecto del plomo sobre la deshidratasa del ácido delta-aminolevulinico (ALA-D) fue claramente identificado por Gibson y col. en 1955 mostrando un efecto inhibitorio que se manifiesta cuando los niveles en el plomo están ligeramente aumentados; provocando así, un indicador biológico para estudios epidemiológicos. Lichtman y Feldman en 1965, fueron los primeros en demostrar el efecto inhibitorio del plomo sobre la enzima en eritrocitos de pacientes intoxicados por plomo, desde entonces el uso de ésta prueba, como un indicador de exposición al metal ha sido estudiado en forma intensa (8). La inhibición de la actividad de ALA-D por plomo ha sido ampliamente estudiada en varios sistemas. Se considera que dicha inhibición es muy sensible y puede ser un valioso parámetro en estudios poblacionales. "In vivo" la inhibición de la ALA-D eritrocítica ocurre tempranamente en la intoxicación plúmbica y por el contrario, su recuperación, una vez cesada la exposición al metal, es muy lenta y es posible que "in vivo" la inhibición sea de tipo irreversible, no así "in vitro" en que se puede lograr casi una

total recuperación de la actividad enzimática con el uso de agentes quelantes (14,29). El mecanismo propuesto para la inhibición de la ALA-D es la modificación de uno o varios de los grupos sulfihidrilos (-SH) que ésta enzima tiene en su sitio activo, en forma directa mediante la unión de un átomo de plomo al radical -SH. Por otro lado se sabe que el tripéptido Glutación (glutamil-cisteinil-glicina) es de primordial importancia en el metabolismo del eritrocito y específicamente interviene en mantener en estado reducido los grupos -SH por lo que también ha sido involucrado en el efecto del plomo sobre ALA-D. Estudios recientes han demostrado un efecto inhibitorio del plomo en la síntesis de la enzima ALA-D, pero su adecuada valoración en clínica aún está en estudio. Si bien la inhibición de la ALA-D por plomo puede considerarse la causa principal de la excreción aumentada del ALA en orina, existen factores, como el aumento de la síntesis de 5-B-H-esteroides que inducen la formación de la enzima sintetasa del ALA, que también podría influir en el aumento de ALA en orina (ALA-U), ya que dicha enzima es además la responsable de la regulación de la vía biosintética del Heme mediante un mecanismo de retroalimentación (Tomokuni y Weisberg 1975) (24,30). En la enzima ALA-D, se presenta una interacción del plomo con zinc, ya que la enzima puede ser: a) Reactivada parcialmente por zinc a después de haber sido inhibida por plomo. b) Se ha sugerido un papel de catión zinc en el sitio activo de la ALA-D, lo cual no es de extrañar pues muchas enzimas polimerizantes tienen zinc en su sitio activo como las polimerasas de ADN Y ARN (Farkos, W.R. 1975, Skreb 1981) (24) (ver FIGURA 1).

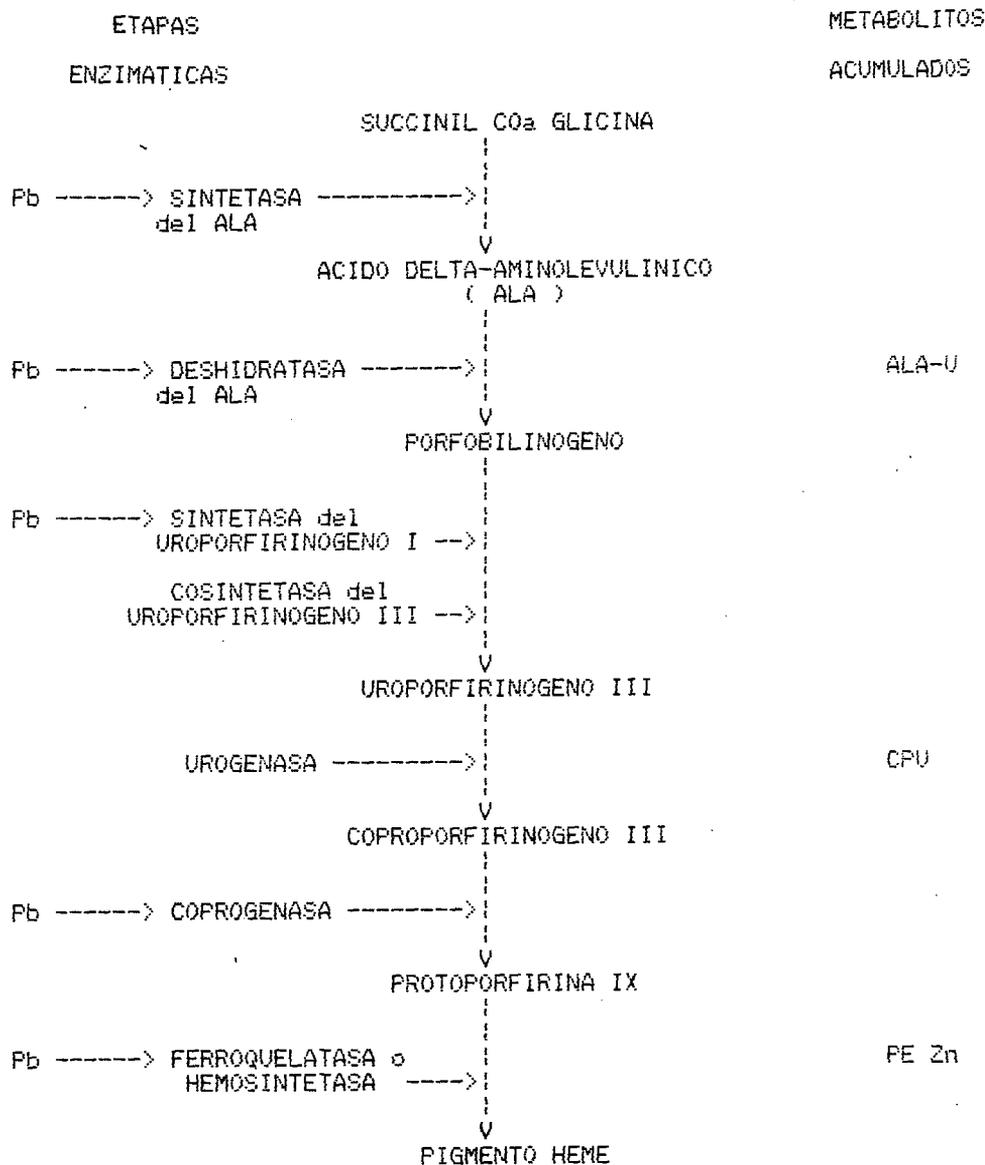


FIGURA 1. Acción del plomo sobre las enzimas de la ruta metabólica de la síntesis del grupo heme.

ACIDO DELTA-AMINOLEVULINICO URINARIO (ALA-U).

Varios estudios han demostrado que la concentración urinaria del ALA es el mejor indicador de intoxicación por plomo y su medición ha sido extensamente usada para la vigilancia médica de los trabajadores expuestos ocupacionalmente al plomo. También se ha demostrado su utilidad para seguir la evolución de los pacientes intoxicados con plomo durante el tratamiento con agentes quelantes (10,21). La mayoría de los métodos publicados para la determinación urinaria de ALA utilizan la reacción de Ehrlich, para poder efectuar la reacción se requiere de una condensación preliminar del ALA con compuestos dicarbonilos tales como: la acetyl acetona o el acetato de etilo para formar un derivado monopirrólico el cual produce un compuesto de color rosa cuando se mezcla con el reactivo de Ehrlich. El método original de Mavzerral y Granick fue modificado por Davis y Andelman en 1967 en el que utilizan cromatografía en columna con resinas de intercambio iónico para separar el ácido de las sustancias interferentes. Las sustancias que pueden interferir pueden ser de tres tipos: 1) Inhibidores de la formación del pirrol, ejemplo, el amonio. 2) Compuestos que pueden condensarse con acetyl acetona para formar un pirrol, ejemplo, la amino acetona. 3) Sustancias que pueden reaccionar directamente en el reactivo de Ehrlich, por ejemplo, el Porfobilinógeno (31).

JUSTIFICACION

En el campo de acción de la Biomedicina, continúa vigente el criterio que establece que las alteraciones bioquímicas en trabajadores expuestos a compuestos inorgánicos de plomo, constituyen indicadores precisos de alteraciones precoces de la salud, aplicables para la evaluación y adopción de medidas preventivas de higiene del trabajo. Sustentar un diagnóstico de intoxicación plúmbica exclusivamente en las alteraciones indicadas por los resultados de exámenes de laboratorio, comunmente dan lugar a un tratamiento médico errático y en ocasiones a lesiones yatrogénas pues dicho tratamiento puede movilizar innecesariamente el plomo inerte de los sitios donde éste se deposita. Por lo que se establece un criterio clínico que toma como base primordial, los signos y síntomas de la intoxicación, conservando así, los exámenes de laboratorio su categoría de auxiliares diagnósticos (8). Debido a que en nuestro medio es muy difícil contar con un espectrofotómetro de Absorción Atómica, de tal forma se hacen análisis preliminares que pongan de manifiesto una posible intoxicación descartando los antecedentes de aquellas enfermedades en las cuales también se presenta una elevación en los niveles de estos metabolitos que intervienen en la biosíntesis del Hema, tal como la Porfiria, la cual es una enfermedad genética con muy baja tasa en nuestra población (32). El examen más practicado y más recomendado en este caso es la determinación de ALA-U (33,34). En razón que a nivel nacional, solo se ha realizado la determinación de la actividad de la ALA-D en la ciudad de Monterrey, Nuevo León. y en el Distrito Federal, no existiendo, actualmente, ningún estudio de esta clase realizado en la ciudad de Guadalajara (30,35). Pretendemos

llevar a cabo un estudio entre los trabajadores expuestos laboralmente al plomo, para conocer de que manera se encuentran los valores de ésta enzima en ellos, considerando que es necesario contar con más pruebas para diagnosticar con mayor eficiencia una intoxicación plúmbica, dado que, el plomo es un contaminante importante por sus efectos en el organismo de los seres humanos, vegetales y en el medio ambiente en general.

OBJETIVOS

I. Determinar la actividad de la enzima delta-aminolevulinico deshidratasa en la sangre de trabajadores laboralmente expuestos al plomo y un grupo control No expuesto en la ciudad de Guadalajara, Jalisco, México.

II. Determinar la cantidad de plomo en sangre de los trabajadores expuestos al plomo y un grupo control No expuesto.

III. Encontrar la correlación entre los valores de la enzima delta-aminolevulinico deshidratasa y plomo en sangre, en trabajadores expuestos.

IV . Valorar las diferencias estadísticas entre el grupo expuesto y el no expuesto al plomo.

HIPOTESIS

Los valores de la actividad de la delta-aminolevulinico deshidratasa se encuentran disminuidos en trabajadores laboralmente expuestos al plomo y se encuentran correlacionados con las determinaciones del plomo en sangre.

MATERIAL Y METODO

- Jeringas de plástico con aguja desechable de 5ml.,marca Plastipak.
- Tubos de Ensaye de 13 x 100 y de 13 x 120.
- Micropipetas de 0.05 y de 1.0ml.
- Torundas de algodón con alcohol.
- Tubos capilares.
- Heparina "Lip-Hepin" de 1,000 U/ml. Laboratorios Riker, S.A. de C.V. Marca 3M.
- Recipiente Térmico con hielo.
- Agitador vortex, modelo: Genie, marca Scientific Industries Inc.
- Centrifuga de Mesa, marca BAS, Optima II para 40 tubos, modelo K-550-G.
- Baño María, marca CDA, modelo B1-40-T.
- Disco Microhematocrito (Lector de Microcápilares) marca Damon/IEC, División-USA.
- Espectrofotómetro, marca Coleman Junior II, modelo 6120.
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer, modelo 2390.

REACTIVOS

- ACIDO DELTA-AMINOLEVULINICO SUBSTRATO (marca Merck Art. 24802) 0.02M; pesar 336 mg. de ácido delta-aminolevulinico y aforar a 100 ml. con agua desionizada.
- BUFFERS DE FOSFATOS 0.3M. Preparar soluciones patrón de Fosfato de Sodio Monobásico (marca; Baker Analyzed, catalogo:3928) y Fosfato de

Sodio Dibásico (marca; Prod. Quim. Monterrey, catalogo;3590), mezclarlas en porciones adecuadas (aproximadamente 50/50) para obtener un pH de 6.8 .

- ACIDO TRICLOROACETICO AL 10% (marca Merck Art. 807), conteniendo $HgCl_2$ 0.1M. Diluir en agua caliente 2.71 g. de $HgCl_2$ hasta que esté bien disuelto, dejar enfriar y añadir 10.0 g. de ácido tricloroacético, agitar y aforar a 100 ml. con agua desionizada.

- REACTIVO DE EHRLICH (marca Merck Art. 3058). Pesar 2 g. de p-dimetil-amino-benzaldehido, disolverlos en 32 ml. de ácido perclórico concentrado (marca Merck Art. 517) y aforar a 100 ml. con ácido acético glacial (marca Merck Art. 1/15800).

- ACIDO NITRICO AL 30% (marca Tecnica Quimica, art. A 1520), medir 30 ml. de ácido nítrico y aforar a 100 ml. con agua desionizada.

COLECTA DE LAS MUESTRAS.

La población a estudiar estaba formada por 26 individuos de ambos sexos y dados los objetivos de este estudio fue necesario formar dos grupos:

La población I : Constituida por 17 individuos, de los cuales 6 eran del sexo femenino y los 11 restantes del masculino, que formaban el grupo CONTROL, es decir, personas NO EXPUESTAS laboralmente al plomo. Las muestras se obtuvieron de sujetos clínicamente sanos que acudían al Banco de Sangre en calidad de donadores en la Clínica-Hospital No. 46 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en esta ciudad.

La población II : Constituida por 9 individuos de sexo masculino que formaban el grupo PROBLEMA, es decir personas laboralmente EXPUESTAS al plomo. Para la obtención de éstas muestras se acudió a la fábrica de Acumuladores ASTROREY, de ésta ciudad, donde había 9 obreros y 2 trabajadores administrativos, se colectaron las muestras del personal expuesto al plomo (Obreros), representando el 100% de los expuestos. A ésta segunda población se les aplicó un cuestionario, con el objeto de recabar algunos datos importantes para la realización de este estudio, el cual fue aplicado por la misma persona con el fin de que la información así obtenida fuera uniforme (anexo), una vez contestado dicho cuestionario, se procedió a la toma de sangre, de la siguiente manera: Para evitar la contaminación de la muestra, se hizo previa limpieza de la piel con una torunda de algodón con alcohol. Inmediatamente se extrajeron aproximadamente 10.0 ml. de sangre por punción venosa en ambas poblaciones. El volumen obtenido de las muestras de sangre fue vaciado a tubos de ensayo limpios con tapones de rosca, los cuales fueron tratados previamente para su desionización (ya que puede existir plomo contaminante por la tubería del agua y la interacción con otros iones que no sean de plomo al realizar la cuantificación tanto de la actividad de ALA-D, como en la determinación de Plomo en Sangre) sumergiéndolos totalmente en una solución de ácido Nitrico al 30%, durante 72 horas. Inmediatamente después se enjuagaron con abundante agua desionizada y se dejaron secar en un horno de secado (marca J.M. Ortiz) a 100 grados C, posteriormente se dejaron destapados en el horno por espacio de 24 a 48 horas a 37 grados C. Los tapones se colocaron sobre papel absorbente a temperatura ambiente. Una vez que los tubos estaban secos se les adicionaron de 2 a 3 gotas de Heparina

de 1,000 U/ml, (evitando con esto la coagulación de las muestras de sangre, al ser vaciadas en estos) posteriormente se etiquetaron y se pesaron en una balanza analítica eléctrica anotando su peso en una de las dos etiquetas de cada tubo, esto con el fin de conocer el peso de la sangre adicionada para la determinación de Plomo por espectrofotometría de absorción atómica. Las muestras fueron transportadas en un recipiente térmico con hielo en un lapso no mayor de una hora para la determinación de las diferentes pruebas de laboratorio. Las determinaciones de Plomo en Sangre por espectrofotometría de absorción atómica, se realizaron en la Clínica-Hospital No. 46 del IMSS. La actividad de la ALA-D fue cuantificada en el laboratorio de Cirugía Experimental de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente (U.I.B.O.) del IMSS. Y en este mismo se realizaron las determinaciones de ALA-U para la población expuesta, pero las determinaciones de ALA-U de la población control se realizó en la Clínica-Hospital No. 46, del IMSS de ésta ciudad.

DETERMINACION DE LA ENZIMA ACIDO DELTA-AMINOLEVULINICO DESHIDRATASA (ALA-D).

FUNDAMENTO:

La deshidratasa del ácido delta-aminolevulinico cataliza la unión de dos moléculas del ácido delta-aminolevulinico para formar una molécula de Porfobilinógeno. Este se hace reaccionar con el reactivo de Ehrlich modificado, para producir un compuesto de color rojo cuya intensidad es medida en un espectrofotómetro. La actividad de la enzima, la cual se encuentra principalmente en eritrocitos, se inhibe en la presencia de plomo.

METODO

La actividad enzimática se midió siguiendo el método de Tomokuni, con las modificaciones propuestas por Wigfield.

Para la determinación de la actividad de ALA-D fué necesario 2.0ml. de la muestra de los 10.0 ml. previamente obtenidos. Una vez que cada muestra se colocó en su respectivo tubo, se taparon y se agitaron suavemente, tanto como para homogenizar la sangre con la heparina, con el fin de evitar su coagulación, así como para evitar una prematura hemolización que afectara los resultados. Se preparó un hemolizado de la sangre colocando 3.25 ml. de agua desionizada a temperatura ambiente y se añadieron 0.5 ml. de sangre, mezclando cuidadosamente para que no se formaran burbujas. Por separado se preparó la mezcla de reacción, colocando en un tubo de ensayo de 13 x 100, 0.5 ml. de ALA sustrato con 0.5 ml. de solución Buffer Fosfatos a un pH = 6.8, manteniendo ésta mezcla por espacio de 5.0 minutos en baño María a 37 grados C., con el objeto de alcanzar la temperatura

de reacción. Inmediatamente después se añadió a la mezcla de reacción 1.5 ml. del hemolizado perfectamente mezclado y se dejó incubar por espacio de una hora a 37 grados C., para que de esta manera se cumpliera la reacción enzima-sustrato. Una vez pasado este tiempo, se retiraron los tubos del baño María y se añadió 1.0 ml. de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, precipitando así todas las proteínas y se agitó inmediatamente después en un vortex quedando homogenizada la mezcla. Posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm. por espacio de 10.0 minutos para dejar libre el complejo de Porfobilinógeno que se formó en el sobrenadante. En otro tubo se pipetearon 1.5 ml. de reactivo de Ehrlich modificado y se añadieron 0.5 ml. de la parte central del sobrenadante del tubo que se centrifugó y se agitó vigorosamente en el vortex. Se dejó en reposo por 10.0 minutos, que es el tiempo más apropiado para que se desarrolle la reacción, y así obtener la mejor lectura en el espectrofotómetro. Seguidamente se procedió a leer en el espectrofotómetro en la región de luz visible previamente calibrado a una longitud de onda de 555 nm. contra un blanco de agua. Para realizar los cálculos de la actividad enzimática se utilizó la siguiente ecuación:

ABSORBANCIA A 555 nm.

$$\text{ACTIVIDAD ENZIMÁTICA} = \frac{\text{-----}}{\text{VALOR HEMATOCRITO.}} \times 109.4 (*)$$

Donde (*) es el factor de dilución y coeficiente de extinción del Porfobilinógeno. Las UNIDADES en que se expresa son MICROMOLES DE PORFOBILINOGENO FORMADO POR LA ENZIMA POR HORA POR MILILITRO DE ERITROCITOS ($\mu\text{M PBG} / \text{h} / \text{ml. e}$), (10).

DETERMINACION DEL VALOR HEMATOCRITO (HTO).

FUNDAMENTO:

El valor Hematocrito se basa en la separación de los glóbulos rojos y el plasma cuando se centrifuga la sangre a 2,200 G durante 6 minutos, el paquete de eritrocitos en 100 ml. es el resultado que se informa.

La determinación del valor Hematocrito se llevó a cabo por medio del micrométodo tradicional de tubos microcapilares, el cual nos dá a conocer el volumen de glóbulos rojos en la sangre, expresado en porcentaje (35).

DETERMINACION DE PLOMO EN SANGRE (Pb-S).

El plomo en sangre se determinó por Espectrofotometría de Absorción Atómica, según el método de Hessel. Los resultados son expresados en ug/100 g. (11).

DETERMINACION DEL ACIDO DELTA-AMINOLEVULINICO EN ORINA (ALA-U).

Esta determinación se llevó a cabo mediante el método cromatográfico de Davis y Andelman, que se expresa en mg/l. (31).

PRUEBAS ESTADISTICAS UTILIZADAS.

Todos los resultados obtenidos de las anteriores determinaciones fueron analizados bajo la Prueba estadística de "t" de Student para comprobar significancia estadística entre dos variables de una población mediante el análisis de los valores promedio de dichas variables. También se aplicó la prueba de "r" de P, llamada Prueba de Correlación de Pearson, que analiza si hay relación entre una variable y otra en una población, buscando significancia y correlación entre ellas. En todos los casos un valor de $p < 0.05$ fué usado para declarar la prueba como significativa.

pintura SI ____ NO ____

III DATOS SOCIO-ECONOMICOS

- 15.- Que grado de escolaridad tiene? _____
- 16.- Que ocupacion desempeña? _____
- 17.- A que nivel socio-economico pertenece? _____
- 18.- Cuantos años tiene de residir en su domicilio actual? ____
- 19.- Cual es la fuente de abastecimiento de agua en su domicilio actual? POZO ____ PIPA ____ OTRO ____
RED DE AGUA POTABLE ____

IV DATOS DE LABORATORIO

- 20.- Pb-S
- 21.- ALA-U
- 22.- Hto.
- 23.- ALA-D

Fecha de la entrevista _____

Nombre del entrevistador _____

RESULTADOS

Los resultados de la POBLACION I, es decir individuos NO EXPUESTOS laboralmente al plomo, son ALA-D con una media de 0.4392 ± 0.1615 , Pb-S con una media de 15.65 ± 6.88 , una media del valor Hematocrito de 47.47 ± 4.69 y ALA-U con una media de 4.87 ± 3 con una $n = 17$ para esta población (ver CUADRO 1,2 y 3). Los resultados de las variables para los individuos laboralmente EXPUESTOS AL PLOMO, es decir la POBLACION II, ALA-D con una media de 0.06465 ± 0.0124 , Pb-S con una media de 138.77 ± 65.24 , el valor Hematocrito con una media de 42.5 ± 4.95 , ALA-U con una media de 34.76 ± 21.26 , con una $n = 9$ para toda esta población, excepto para ALA-U que su población fue $n = 8$ (CUADRO 1,2 y 3). No hubo resultados congruentes al efectuar la prueba estadística de Correlación "r" de Pearson en ambos grupos. Por lo cual se practicó la prueba de "t" de Student (la cual analiza y compara los promedios entre dos variables de dos poblaciones) sobre las siguientes variables.

Al realizar las pruebas de "t" de Student para buscar significancia estadística de los resultados de la ACTIVIDAD DE ALA-D entre los promedios de las dos poblaciones, se observó: Entre el promedio de 0.4054 ± 0.1580 con una $n = 11$ de los HOMBRES NO EXPUESTOS (grupo control) y la POBLACION PROBLEMA (grupo expuesto al plomo) con un promedio de 0.06465 ± 0.0123 , $n = 9$, se encontró una diferencia significativa entre sus valores promedio con una $p < 0.01$ (ver cuadro no. 3). Cuando se realizaron los exámenes de comparación entre las MUJERES DEL GRUPO CONTROL con un promedio de 0.5012 ± 0.1625 y $n = 5$, y los HOMBRES DEL MISMO GRUPO, de promedio $0.4054 \pm$

0.1580 y n = 11, NO se encontró diferencias estadísticas significativas, lo cual indica que la actividad enzimática es igualmente eficiente para ambos sexos de la misma población (ver cuadro no. 3). Al comparar la actividad promedio de ALA-D de MUJER CONTROL con un promedio de 0.5012 ± 0.1625 y n = 6, contra HOMBRE INTOXICADO por plomo con un promedio de 0.0646 ± 0.0124 y n = 9, se observó que sí existe una significancia estadística con una $p < 0.01$, lo cual indica que si normalmente no hay diferencias entre sexos de la población control, sí se manifiesta cuando se compara un grupo de sexo femenino control frente al sexo masculino intoxicado con plomo. Al analizar la POBLACION TOTAL DE INTOXICADOS con un promedio de 0.0646 ± 0.0124 y n = 9 en lo que se refiere a la ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ALA-D, existió una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.01$, en relación con el promedio de 0.4392 ± 0.1615 y n = 17 de la POBLACION CONTROL, ya que en esta ambos sexos se comportan igual (ver cuadro no.3) (FIGURA 2).

En los valores obtenidos de las pruebas de cuantificación del VALOR HEMATOCRITO, al realizar las comparaciones entre HOMERES CONTROL con un promedio de 50.27 ± 2.83 , de n = 11 y HOMERES EXPUESTOS de promedio 42.5 ± 4.95 , n = 9, fueron significativos estadísticamente con una $p < 0.01$ lo que indica que los intoxicados tienen disminuido el volumen de eritrocitos (ver cuadro no.3). Respecto al VALOR HEMATOCRITO de promedio 50.27 ± 2.83 y n = 11 de HOMERES CONTROL contra el promedio de 42.33 ± 2.33 y n = 6 de las MUJERES CONTROL, se encontraron valores significativos estadísticos; $p < 0.01$, esta situación fue reportada con anterioridad en la literatura Internacional sobre hematología y se acepta como "normal"

(36). Al comparar los VALORES HEMATOCRITO entre HOMBRE INTOXICADO con un promedio de 42.5 ± 4.95 y una $n = 9$, y la MUJER CONTROL de promedio 42.33 ± 2.33 y una $n = 6$, no se observó diferencia estadística alguna, lo que indica que los valores hematocrito de las mujeres control son igualmente bajos que los valores de los hombres intoxicados. Las pruebas de comparación del VALOR HEMATOCRITO TOTAL de CONTROLES con un promedio de 47.47 ± 4.69 y $n = 17$, contra el valor hematocrito TOTAL de EXPUESTOS con un promedio de 42.5 ± 4.95 y $n = 9$, da una diferencia estadística significativa de $p < 0.02$; lo que se cuestiona en su validez por existir mujeres en el grupo control (FIGURA 5 y FIGURA 6).

Respecto a PLOMO EN SANGRE (Pb-S) los resultados de las pruebas realizadas con HOMBRES CONTROL de promedio 15.27 ± 7.43 y $n = 11$ y HOMBRES INTOXICADOS con un promedio de 138.77 ± 65.24 $\mu\text{g}/100$ g., $n = 9$ la cual mostró una $p < 0.01$, indicando con esto claramente que los valores de plomo en Hombres Intoxicados son muy elevados cuando son comparados con los de HOMBRES CONTROL. Por otra parte, al analizar los resultados del PLOMO EN SANGRE de HOMBRES CONTROL con un promedio de 15.27 ± 7.43 y $n = 11$ contra MUJERES CONTROL con un promedio de 16.35 ± 6.35 y $n = 6$, se demostró que no hay diferencia significativa entre estos, por lo cual se concluye que se intoxican igualmente mujeres y hombres. Los resultados de PLOMO EN SANGRE entre HOMBRES INTOXICADOS con un valor promedio de 138.77 ± 65.24 y $n = 9$ y MUJER CONTROL de promedio 16.35 ± 6.35 , $n = 6$, presentaron diferencias estadísticas significativas con una $p < 0.01$ (cuadro 3). En las pruebas para determinar los niveles de PLOMO EN SANGRE realizadas a los GRUPOS TOTAL CONTROL y TOTAL INTOXICADOS, con un promedio del primero de 15.65 ± 6.88 y $n = 17$ contra 138.77 ± 65.24 n

= 9 de promedio del segundo, se encontró un valor estadístico significativo de $p < 0.01$ al realizar la prueba de "t" de Student, lo que demuestra que hombres y mujeres se intoxican igualmente. En este caso se observa que hombres control y mujeres control no están intoxicados (FIGURA 2 y FIGURA 5).

En lo que se refiere a los resultados obtenidos de ALA-U cuando se comparó el promedio de 4.7 ± 3.1 mg/L. $n = 11$ de los hombres control contra un promedio de 5.0 ± 2.3 mg/L. $n = 6$ de las mujeres control no se observa diferencia estadística significativa. Cuando se analizó el grupo control de hombres con un promedio de 4.7 ± 3.1 $n = 11$ contra los hombres expuestos con un promedio de 34.8 ± 19.8 $n = 8$ presentaron diferencias estadísticamente significativas con $p < 0.01$. Cuando se aplicó la prueba "t" de student sobre mujeres control con un promedio de 5.0 ± 2.3 y $n = 6$ frente al promedio de 34.8 ± 19.8 $n = 8$, de los hombres expuestos se observa una diferencia estadística significativa de $p < 0.01$. Al analizar el total control en lo que se refiere a ALA-U con un promedio de 4.8 ± 2.9 y $n = 17$ con respecto al grupo expuesto de promedio 34.8 ± 19.8 y $n = 8$ presentó una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.01$. Con lo cual se pone en manifiesto que la población control difiere en sus valores al compararla contra la población expuesta ya que las concentraciones de esta difieren de los normales establecidos (FIGURA 3 y FIGURA 4).

CUADRO 1.

MUESTRA	edad	sexo	Pb-S ug/100g.	ALA-D uMPBG/h/mle	Hto	ALA-U mg/l
1	36	masc	4.2	0.3786	52	0.9
2	36	fem	6.4	0.3646	45	1.4
3	21	masc	8.5	0.5148	51	3.9
4	25	masc	9.3	0.3418	48	4.1
5	48	masc	9.3	0.2051	48	8.4
6	44	masc	11.2	0.2917	45	1.7
7	36	fem	13.6	0.6137	41	6.3
8	30	fem	15.0	0.4102	40	5.2
9	51	masc	15.0	0.1786	49	12.0
10	34	masc	17.1	0.6006	51	1.9
11	34	fem	18.0	0.3035	40	6.9
12	34	masc	19.0	0.5470	50	5.3
13	37	fem	19.9	0.6106	43	7.9
14	36	masc	23.6	0.5274	56	2.1
15	22	masc	24.0	0.6006	51	7.1
16	34	fem	25.2	0.7050	45	2.5
17	25	masc	26.8	0.2735	52	5.2

Resultados de la población no expuesta o grupo control.

CUADRO 2

MUESTRA	antigüedad años	sexo	Pb-S ug/100 g	ALA-D mPBG/h/mle	Hto %	ALA-U mg/l
1	< 1	masc	83	0.05707	46	15.3
2	6	masc	94	0.05730	42	27.2
3	2	masc	98	0.07197	38	58.1
4	30	masc	103	0.08271	41	11.9
5	4	masc	107	0.05758	38	21.6
6	< 1	masc	130	0.06251	49	---
7	< 1	masc	145	0.04330	48	68.9
8	1	masc	209	0.07134	46	50.6
9	30	masc	280	0.07814	35	25.9

Resultados de la población expuesta.

CUADRO 3

variable	poblacion control			poblacion expuesta		
	media	devstd	n	media	devstd	n
-Plomo en sangre ug/100 g	15.65	6.98	17	138.77	65.24	9
-Enzima ALA-D UMF5G/h/ml	0.4392	0.1615	17	0.0646	0.0124	9
-Valor Hto %	47.47	4.69	17	42.50	4.95	9
- ALA-U mg/l	4.8	2.9	17	34.75	21.26	8

Medias aritméticas de la población control y de la población expuesta.

INDICES DE ABSORCION DE PLOMO. (tomado de: Barry, P.S. British Medical Journal; pp.22, 1968.).

PRUEBA	NORMAL	ACEPTABLE	EXCESIVA	PELIGROSA
Pb-S ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	40	40-80	80-120	120
ALA-U (mg/l)	5	5-20	20-40	40

FIGURA 3

ACTIVIDAD DE ALA-D VS ALA-U

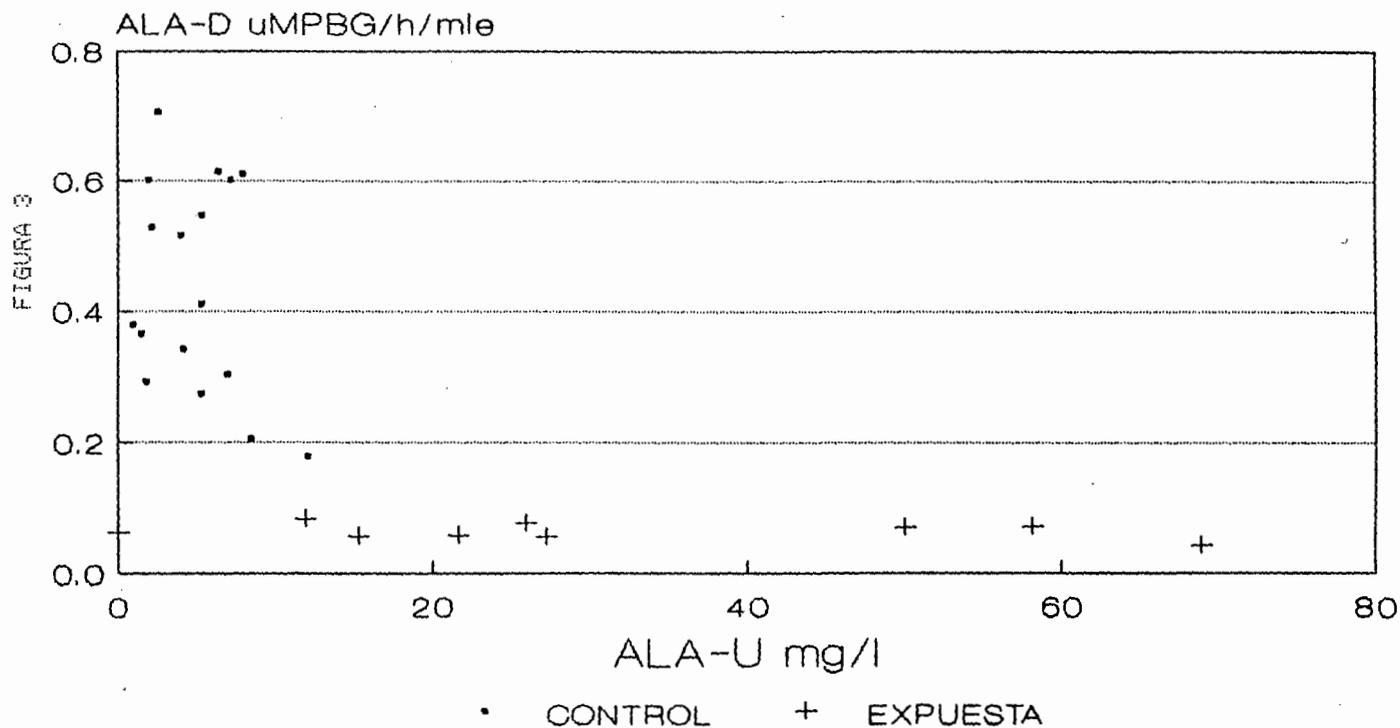


FIGURA 4

ALA-U VS Pb-S

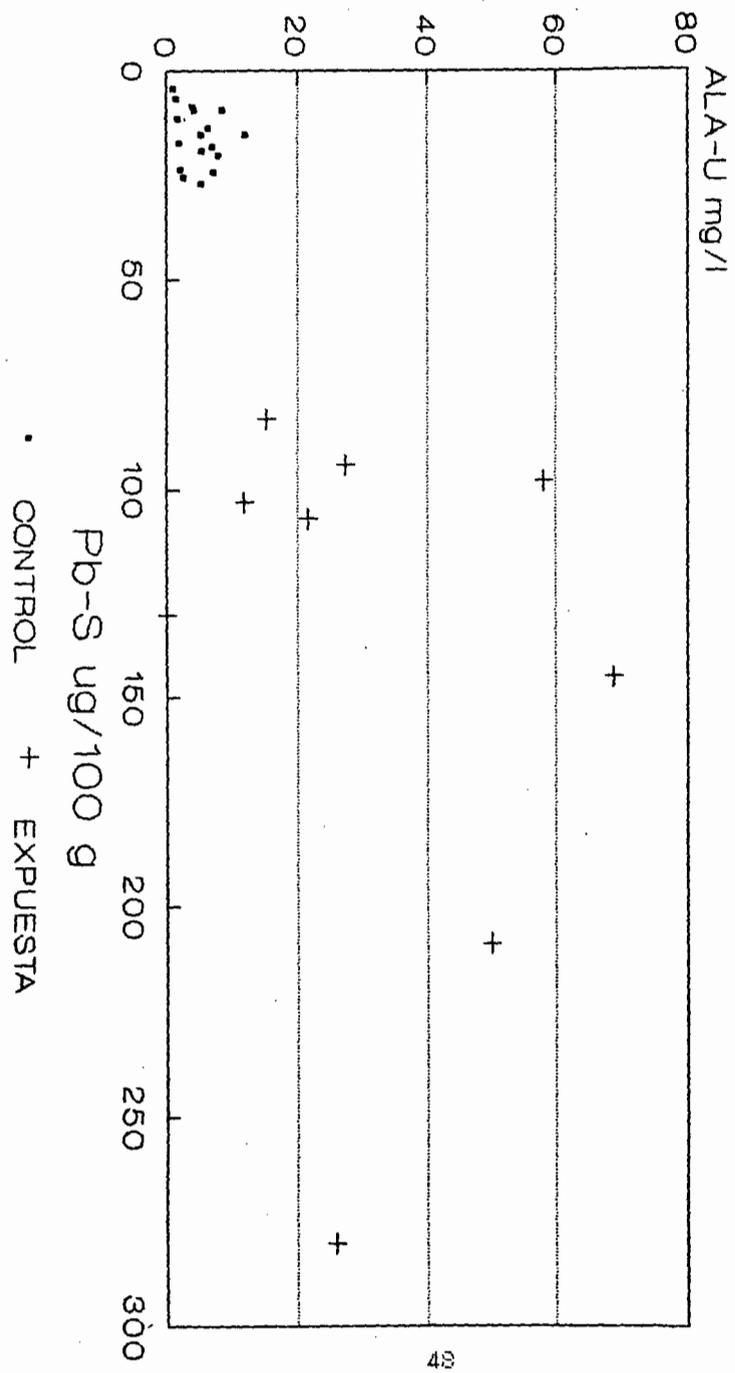


FIGURA 4

FIGURA 5

VALOR Hto VS Pb-S

FIGURA 5

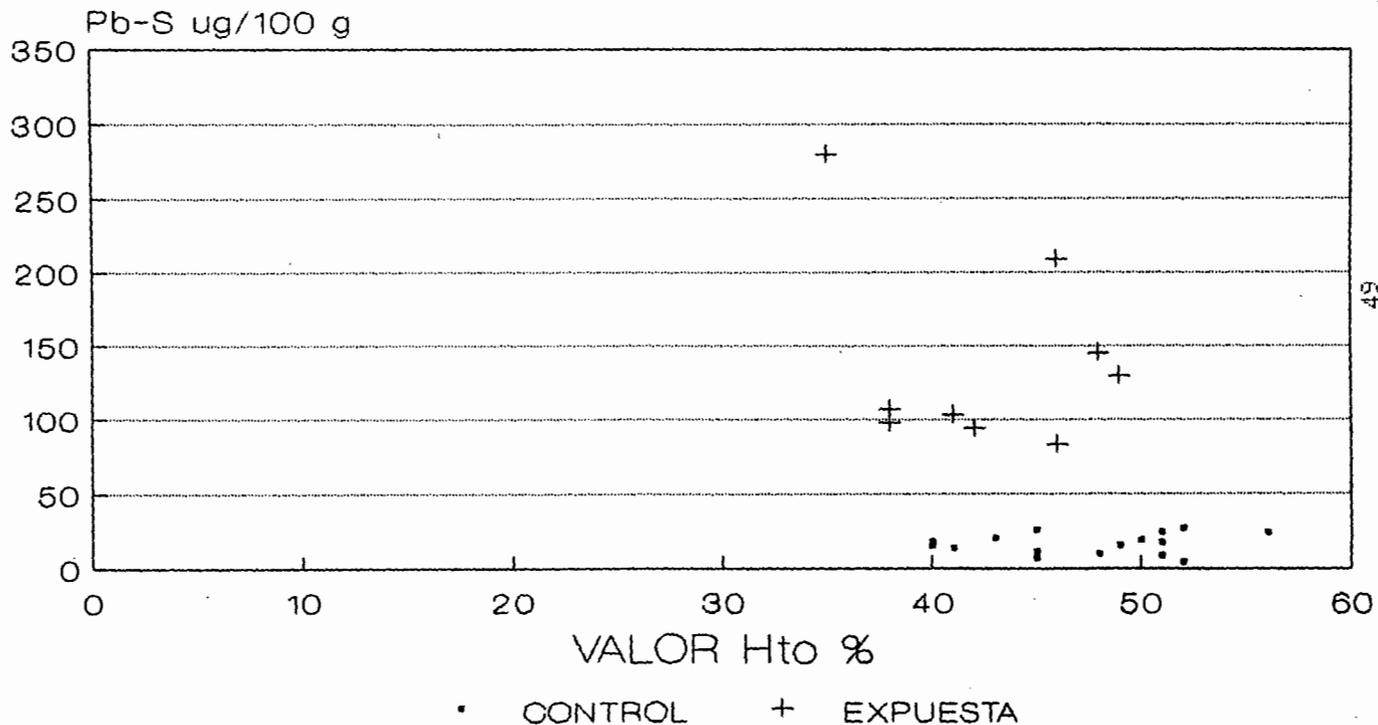
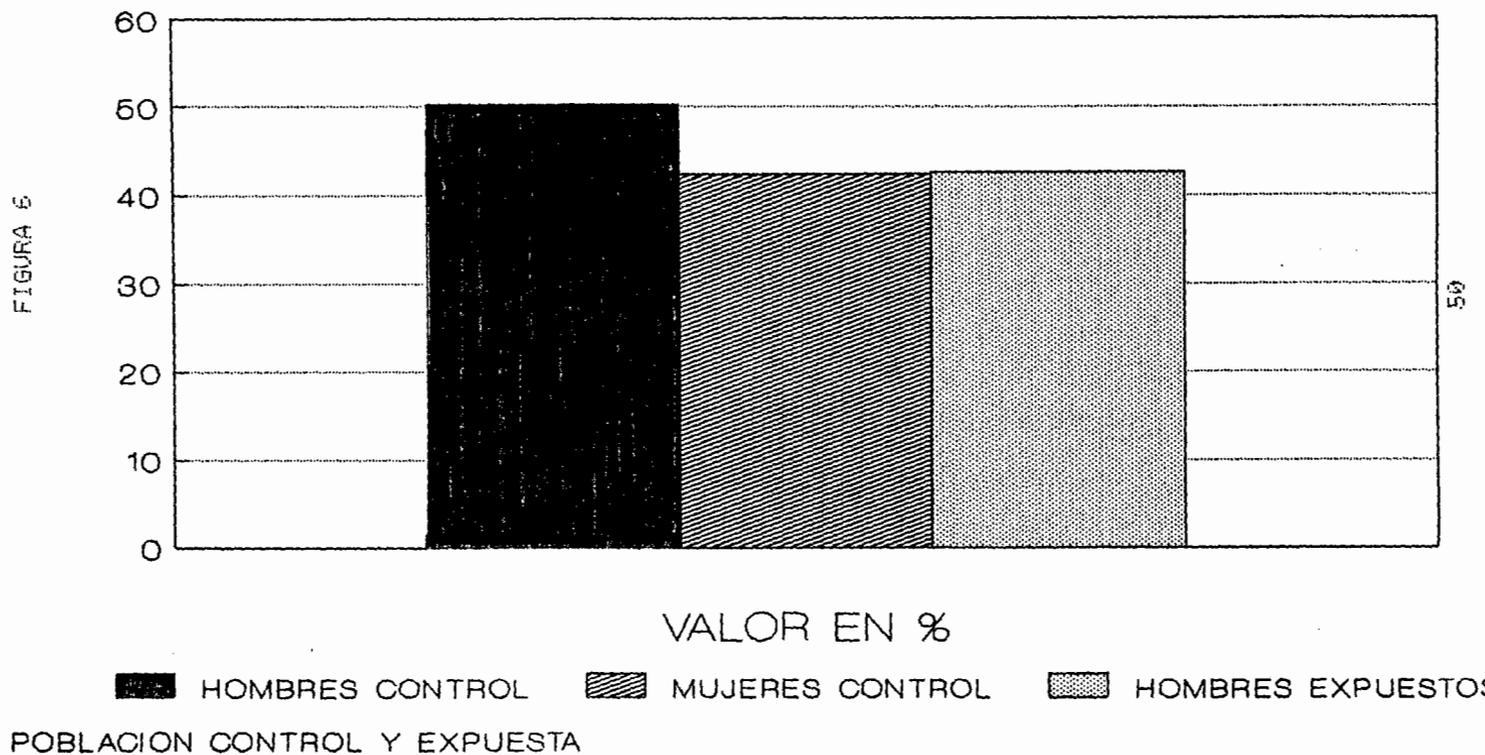


FIGURA 6

VALOR HEMATOCRITO



DISCUSION

En lo que respecta a los valores obtenidos de la ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ALA-D de la población NO EXPUESTA, se acepta en la literatura internacional que dicha actividad en la población general tiene una gran variación individual y se ha demostrado que en diferentes poblaciones con exposición ambiental al plomo pueden influir factores hereditarios además de los ambientales, en la actualidad son requeridos estudios inmunquímicos para la efectiva evaluación de la influencia genética sobre la regulación genica y la actividad catalítica de esta enzima, para ver si son el resultado de una variación cualitativa o cuantitativa (6, 40, 41). Debido a esto nos es difícil establecer que obtuvimos un valor de normalidad en la población control, pero son una buena referencia para estudios posteriores, ya que las actividades obtenidas son altamente significativas estadísticamente hablando, cuando son comparadas con los valores promedio de la actividad de ALA-D de la población expuesta al plomo, por lo cual se puede establecer que efectivamente la determinación de la actividad de esta enzima, es un indice sensible y específico para medir cambios bioquímicos causados por este metal, tanto en una población expuesta laboralmente y en una no expuesta al plomo en cualquiera de sus tipos aguda o crónica. Así también la Intoxicación SUECLINICA por plomo se puede detectar mediante la cuantificación de ALA-D (30). Por lo tanto, se considera que su aplicación en el conjunto de pruebas de laboratorio para la determinación clínica de una intoxicación plúmbica es determinante, conjuntamente con las determinaciones directas que de esta enfermedad se hagan. Por otra parte si bien es importante la cuantificación de

ALA-U, como parte del grupo de pruebas para poner de manifiesto el efecto de este metal en el organismo, este estudio deja ver que la determinación de ALA-D que es una prueba de laboratorio sino más importante que la anteriormente mencionada, es determinante y por lo cual sugerimos que debería de incluirse en el conjunto de determinaciones para detectar el daño causado por el plomo, ya que como se puso de manifiesto en los antecedentes, da a conocer al daño bioquímico causado por este metal, siendo este nivel donde se presentan primariamente los síntomas de esta enfermedad y una vez conociendo dichas alteraciones será posible corregirlas y prevenir las antes de que ocurra un daño posterior.

En lo que respecta a las determinaciones de PLOMO EN SANGRE (Pb-S) en la Población NO Expuesta al plomo se observó que cuando es comparada frente a los valores obtenidos de la Población expuesta laboralmente a este metal, se deduce que la población Control se manifestó como tal, ya que su promedio corresponde a los valores "normales" establecidos (CUADRO 3), los cuales aún están en discusión tanto en la Literatura Internacional como en los pocos estudios nacionales al respecto (29, 30), probablemente ocasionado por las aparentes adaptaciones que han experimentado los organismos vivos en el tiempo ante este tipo de intoxicaciones. Al analizar el valor promedio de la población Expuesta en lo que respecta a Pb-S con un promedio de 138.77 ± 65.24 y $n=9$ $\mu\text{g}/100$ g. cae dentro de la Clasificación de Barry P.S. en 1968 en la categoría de aceptable. La población expuesta al metal estaba formada por individuos que habían recibido algún tratamiento médico periódico contra la exposición al plomo (hacia 3 meses), en el cual son estabilizados hasta lograr un nivel "normal" de plomo en su organismo, mediante medicamentos

(agentes quelantes) e incapacidades laborales. Independientemente de ello se encontraron valores elevados (anormales) de Pb-S de acuerdo a la clasificación antes mencionada y estas cantidades corresponden a una inhibición total de la actividad enzimática de ALA-D encontrada en ellos, ya que su apariencia clínica era casi "normal", este dato apoya la sugerencia de que existe una ruta biosintética alternativa en la biosíntesis del Heme (Biosíntesis de Novo), aún no conocida exactamente y por lo cual los valores de la hemoglobina no se ven alterados (29). El 45% de la población expuesta tenía una antigüedad laboral igual o menor a 1 año, a pesar de esto, mostraron índices elevados al analizar su promedio de 141.75 ug/100 g. lo que los pone cerca de la categoría de Excesiva (150ug/100g) dentro de la clasificación antes mencionada. Estos individuos no presentan aparentemente la sintomatología de una intoxicación plúmbica, pero al asociar estas concentraciones con las de la actividad enzimática de ALA-D en ellos, se observa que está totalmente inhibida, lo que apoya la utilidad antes mencionada al realizar esta determinación enzimática en el control y prevención de una posible intoxicación plúmbica. Por otra parte el 55% de la población expuesta al plomo presentó una antigüedad promedio de 14.4 años con un promedio de 136.4 ug/100g de Pb-S cayendo dentro del nivel de Aceptable, pero fue evidente el daño que estos presentan en su apariencia clínica, así como se comprobó bioquímicamente cuando se evaluó el efecto sobre la enzima ALA-D, la cual se encontraba totalmente inhibida.

Los valores HEMATOCRITO de la población expuesta, nos hablan de una alteración en la biosíntesis del Heme, ya que es evidente la considerable disminución en el volumen de glóbulos rojos

en la sangre de estos individuos, pero no se ha establecido el mecanismo que ocasiona esta disminución en cuanto a su evaluación bioquímica se refiere en la literatura nacional e internacional. El que el grupo expuesto careció de personas del sexo femenino presentó una $p < 0.02$ cuando se comparó con el promedio total del grupo control (hombres y mujeres), en cuanto al valor hematocrito se refiere, situación no reportada en publicaciones internacionales recientes. Aunque se pone de manifiesto que la actividad enzimática es igualmente eficiente para ambos sexos, así como también que hombres y mujeres se intoxican igualmente, lo que indica que es muy posible que esta situación sea verdadera, haciendo necesario ampliar la información al respecto.

No se encontró un índice de correlación entre los valores de Pb-S contra las determinaciones de actividad de ALA-D, al aplicar la prueba estadística de correlación de "r" de Pearson, debido en parte al reducido número de casos expuestos en este estudio, sin embargo ésta situación está en controversia en la literatura internacional, ya que en 1974 Sakurhal y Col. si encuentran una correlación entre estos índices en el grupo expuesto al metal, pero no en el testigo. En cambio Wada y Col. en 1976 no encuentran correlación entre la concentración de Pb-S y la actividad de ALA-D en una población urbana y otra rural de Japón y proponen que por abajo de los 15 ug/dl de Pb-S no hay relación entre estos dos índices. Flindt y Col. quienes estudiaron una población de choferes de taxis, en E.U.A., tampoco encuentran una correlación entre la inhibición de ALA-D y los valores de Pb-S. Debe considerarse por lo tanto, que la correlación descrita en diferentes estudios, que agrupan a las poblaciones No expuesta y expuesta, se establece principalmente a

base de la población expuesta, ya que en el análisis por separado de la población no expuesta no se observa esta correlación. Esto sugiere que debe existir una concentración "límite" de plomo en sangre para que se presente esta correlación. En trabajos anteriores se han sugerido límites amplios para esta concentración, la cual va desde 15 hasta 35 ug/dl a la cual empieza a manifestarse esta correlación, por lo cual se pensó que este fenómeno se manifiesta de forma no lineal, sino describiendo una curva sigmoidea (6,14,29,30,38).

Por lo tanto debido a la poca información encontrada en nuestro medio en lo que se refiere a estas determinaciones y la inconciencia ante las perspectivas de este problema se sugiere:

- Que la realización de estudios como este estimule a desarrollar otros más completos realizados conjuntamente por distintos especialistas. Con este enfoque interdisciplinario, conocer más a fondo ésta situación como un modelo de lo que puede suceder si no aprendemos a explotar de manera conciente la naturaleza para nuestro beneficio y la conservación de ésta.

CONCLUSIONES

1. Los valores de la actividad enzimática de la enzima ácido delta-aminolevulinico deshidratasa son diferentes y estadísticamente significativos entre la población no expuesta y la otra expuesta laboralmente al plomo, poniendo de manifiesto que el uso de esta determinación dentro de la batería de pruebas como un índice efectivo en la intoxicación plúmbica.

2. Al comparar la cantidad de Pb-S de la población expuesta laboralmente al plomo contra el grupo control, personas no expuestas laboralmente a éste metal, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) siendo el valor promedio de la primera de 138.77 ug/100g. y para la segunda de 15.65 ug/100 g.

3. No se encontró un índice de correlación entre los valores de la actividad enzimática de ALA-D frente a la concentración de Pb-S de la población laboralmente expuesta al plomo, así tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa al no existir correlación entre dichas variables de la población no expuesta laboralmente al plomo.

4. Cuando se realizó la prueba de "t" de Student a las determinaciones de ALA-D entre mujeres del grupo control con un promedio de 0.5012 ± 0.1525 y $n=5$ y los hombres del mismo grupo con un promedio de 0.4054 ± 0.1580 y $n=11$, no se encontró diferencia estadística; lo que indica que la actividad enzimática es igualmente eficiente para ambos sexos de la misma población.

5. El valor hematocrito está disminuido en los individuos expuestos laboralmente al plomo con un promedio de 42.50 % de

glóbulos rojos, cuando éste es comparado con el promedio de 50.27 % de volumen de eritrocitos de los individuos del sexo masculino que no están expuestos laboralmente a este metal y este valor de los hombres intoxicados es igualmente bajo que el valor promedio de 42.33 % de glóbulos rojos en la sangre de las mujeres del grupo control.

6. Al analizar los resultados de los niveles de Pb-S de los hombres control con un promedio de 15.27 ug/100g y n = 11 contra Mujeres control con promedio de 16.35 ug/100g y n = 6 concluyó que se intoxican igualmente mujeres que hombres al no encontrar diferencias estadísticamente hablando.

7. Al analizar los valores obtenidos entre ALA-U contra Pb-S de la población expuesta se concluyó que si existe un aumento de ALA-U cuando aumentan los valores de Pb-S de la población laboralmente expuesta al plomo, no quedando establecido como un efecto lineal.

8. Es necesario profundizar en este tema y similares mediante el desarrollo de estudios más amplios realizados interdisciplinariamente, lo cual esclarecerá el verdadero impacto de este fenómeno y poder conocer, analizar y prevenir las perspectivas de éste, en el desarrollo tan desmesurado en que vivimos, que no nos permite evaluar el efecto de las actividades humanas sobre su medio en particular y sobre la naturaleza en general.

LITERATURA CITADA

1. Alvarez, P.J.M. Determinación del Acido delta-aminolevulinico Urinario en Trabajadores de Fábricas de Acumuladores. Universidad de Guadalajara (Méx). Tesis Profesional, 1981.

2. OPS/OMS. Criterios de Salud Ambiental No.3.Plomo. Publicación científica No.355,(Méx) 1979.

3. Garcia de Alba, G. J. E. y Col. Niveles de Plomo en Alfareros.Higiene (Méx), 29 (8): pp. 129-139,1979.

4. Cendejas, H.S.,Díaz,G.A. El Problema de la Toxicidad en la Loza Artesanal Mexicana. Salud Pública de México; 16 (1): 83-88, 1974.

5. Schroeder,H.A.,Balassa,J.J. Abnormal Trace metals in man. lead J. Chron. Dis; 14: 408, 1961. En: Intoxicación Plúmbica en Adultos.Serie IMSS (Méx), 1985.

6. Mitchell,R.A., Drake,J.E.,et al. Erythrocyte Porphobilinogen Synthase (Delta-aminolaevulinata Dehydratase) activity;A reliable and Quantitative Indicator of Lead Exposure in Humans. Clinical Chemistry; 23 (1): 105-111, 1977.

7. Molina-Ballesteros,G.(ed). Intoxicación por Plomo. Serie IMSS (Méx), 1986.

8. Legaspi-Valasco,J.A.(ed). Intoxicación Plúmbica en Adultos.Serie IMSS (Méx), 1985.

9. Molina-Ballesteros,G., González,R.D.,Zuñiga-Charles,M.A. Indicadores Biologicos (cap.V).En: Molina-Ballesteros,G.(ed).Intoxicación por Plomo,serie IMSS (Méx): 81-85 pp. 1986.

10. Zuñiga-Charles,M.A., González,R.D. Pruebas de laboratorio (cap.IV).En: Molina-Ballesteros,G.(ed). Intoxicación por Plomo.Serie IMSS (Méx), pp. 51-79. 1986.

11. Hessel,D.W. A simple and rapid quantitative determination of lead in blood. Atomic Absorption Newsletter; 7: 55, 1968.

12. Kehoe,R.A. Occupational lead poisoning;I Clinical Types,II Chemical Signs of the absorption of lead. J. Occup. Med.: 14 (5): 298, 390-396, 1972.

13. Marcus,H.A. Multicompartement kenetic model for lead. Environmental, research. 36: 473-489, 1985.

14. Weissberg, J.B.,et al. Delta-aminolevulinic-acid dehydratase activity in circulating blood cells. N. Eng. J. Med. 284 (11): 565-569, 1971.

15. Rabinowitz, B.M., Wetherill, W.G., et al. Magnitude of lead intake from respiration by normal man. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 90 (2): 238-248, 1977.

16. Solares, A.R., Cuevas, M.G. y col. La metalosis y su significado en la osteosíntesis. *Rev. Med. del IMSS (Méx)*, 17 (1): 7-14, 1978.

17. Phil, R.O., Pardis, M. Hair element content in learning disabled children. *Science*, 198: 204-206, 1977.

18. Shapiro, M.I., Gal-Mitchell, M.A., et al. The lead content of teeth. *Arch-Environ Health*, 30: 483-486, 1975.

19. Roels, H.A., et al. Response of heme biosynthetic pathway parameters in men, women and children moderately exposed to lead. *International Conference inference in health in the environmental*. pp. 105-124, 1975.

20. Molina, B.G., Zuñiga-Charles, M.A. y col. Correlación entre Hemoglobina y Acido delta-aminolevulinico urinario en sujetos expuestos al plomo. *Rev. Invest. Clín. (Méx)* 31: 245-249, 1979.

21. Molina-Ballesteros, G., Zuñiga-Charles, M.A. y col. Determinación del ácido delta-aminolevulinico urinario en una población expuesta al plomo. *Archivos de Invest. Médica (Méx)*, 7 (3): 115-122, 1976.

22. Zuñiga-Charles, M.A., et al. Erythrocyte Protoporphyrin IX as a diagnostic and Therapy evaluating Tool in lead poisoning. *Arch. Environ. Health*, 36: 40-43, 1981.

23. Solís-Cámara, R.P. Alteraciones neuro-psicológicas en niños expuestos a dosis "subtóxicas" de plomo. En: Molina-Ballesteros, G.(ed). *Intoxicación por plomo. Serie IMSS (Méx)*; pp.22-36, 1986.

24. Sánchez-Anzaldo, F.J. Bioquímica de la intoxicación por plomo.(cap. I). En: Molina-Ballesteros, G.(ed). *Intoxicación por plomo. Serie IMSS (Méx)*; pp. 9-21, 1986.

25. Lehninger, A.L. *Bioquímica. Segunda edición*; ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. Capítulos 4-9. 1982.

26. Gibbs, F.N.B., et al. Purification and properties of 5-aminolaevulinatase dehydratase from human erythrocytes. *Biochem J*. 230: 25-34, 1985.

27. Anderson, F.M., Desnick, R.J. Purification and properties of delta-aminolevulinatase dehydrase from human erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 254 (15): 6924-6930, 1979.

28. Bevan, D.R., Shemin, D., et al. Mechanism of Porphobilinogen Synthase. *The journal of Biological Chemistry*, 255 (5): 2030-2035, 1980.

29. Nakao, L., Wada, O., Yano, Y. Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes for the evaluation of lead poisoning. *Clin. Chem. Acta.* 19: 319, 1968.

30. Sanchez-Anzaldo, F. J., Zuñiga-Charles, M. A., Molina, G. B., y col. Correlación estadística entre dashidratasa del ácido delta-aminolevulinico y el plomo sanguíneo en poblaciones humanas expuestas y no expuestas al plomo, modelo tentativo. *Arch. Invest. Méd. (Méx)*, 15 (2): 93-107, 1984.

31. Davis, J. R. Method for determination of ALA-U. *Arch. Environ. Health.* 15: 53-57, 1962.

32. Marver, H. S., Schmid, R. The Porphyrrias. En: *The metabolic Basis of Inherited Disease*. Ed. 3. Stanbury, J. B., et al (ed) New York. Mc. Graw-Hill Book Co. pp. 1087-1097, 1972.

33. Molina-Ballesteros, G., Zuñiga-Charles, M. A., et al. Urinary Delta-aminolevulinic acid as a biological indicator through penicillamine therapy in lead intoxication. *Arch. Environ. Health*: pp. 309-312, 1978.

34. Molina, G. B., y col. Plomo: sus implicaciones sociales y efectos sobre la salud. *Gaceta Médica de México.* 115 (2): 57-64, 1979.

35. Perez-Zapata, J. A. Analisis estadístico de la contaminación por plomo en la ciudad de México. En: *Memorias del V curso y simposio internacional sobre biología de la contaminación.* pp. 24, 1987.

36. Bayardo, P. B. E., *Apuntes de Analisis Clinicos.* Editorial Universidad de Guadalajara (México): pp. 66, 1971.

37. Specter, J. M., et al. The unsuitability of random urinary delta-aminolevulinic acid samples as a screening test for lead poisoning. *The Journal of Pediatrics.* 79 (5): 799-804, 1971.

38. Tomokuni, K. New Method for determination of aminolaevulinate dehydratase activity of human erythrocytes as an index of lead exposure. *Clin. Chem.* 20 (10): 1287-1291, 1974).

39. Gibbs, P. N. S., Jordan, P. M. Identification of Lysine at the active site of human 5-aminolaevulinate dehydratase. *Journal of Biochemistry.* 236: 447-451, 1986.

40. Telisman, S. Significance of delta-aminolevulinic acid dehydratase in lead poisoning. *Journal of Pediatrics.* 112 (1): 153-154, 1988.

41. Morris, V., Markowitz, M. E, et al. Serial measurements of aminolevulinic acid dehydratase in children with lead toxicity. *Journal of Pediatrics.* 112 (6): 916-919, 1988.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente
 Número 261/89

SR. CLAUDIO PRECIADO CUEVA
 P R E S E N T E . -

Por este conducto nos permitimos informar a usted que se autoriza el cambio de título de Tesis "DETERMINACION DE LA DELTA-AMINOLEVULINICO DESHIDRATASA EN TRABAJADORES LABORALMENTE EXPUESTOS AL PLOMO" por el de "DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ACIDO-DELTA-AMINOLEVULINICO DESHIDRATASA EN TRABAJADORES LABORALMENTE EXPUESTOS AL PLOMO".

Sin otro particular nos es grato reiterar a usted la expresión de nuestra consideración más distinguida.

A T E N T A M E N T E
 "PIENSA Y TRABAJA"
 Guadalajara, Jal., Marzo 11 de 1989

EL DIRECTOR

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA



FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

ING. ADOLFO ESPINOSA DE LOS MONTEROS CARDENAS

c.c.p. El Q. E. B. Adolfo Cárdenas Ortega, Director de Tesis.-Pte.
 c.c.p. El expediente del alumno.

Boulevard a Tlaquepaque y Corregidora, S. R.

Teléfonos 19-30-54 y 19-32-92

Guadalajara, Jal.

'mjsd

Al contestar esta oficio cítese fecha y número



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente
Número 947/88

SR. CLAUDIO PRECIADO CUEVA
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de Tesis "DETERMINACION DE LA DELTA-AMINO_
LEVULINICO DESHIDRATASA EN TRABAJADORES LABORALMENTE EXPUES
TOS AL PLOMO" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido acep
tado como Director de dicha Tesis el Q.F.B. Adolfo Cárdenas
Ortega.



FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E
"AÑO ENRIQUE DIAZ DE LEON"
"PIENSA Y TRABAJA"
El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario

Ing. Adolfo Espinoza de los Monteros Cárdenas,

c.c.p. El Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega, Director de Tesjs.-Pte.
c.c.p. El expediente del alumno.

!mjsd

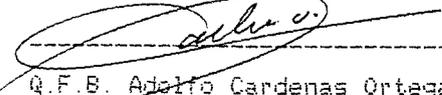
C. Dr. Carlos Astengo Osuna
Dir. Facultad de Ciencias
Universidad de Guadalajara
P R E S E N T E:

Por medio de la presente comunico a Usted que el C. Claudio Preciado Cueva, pasante de la Licenciatura en Biología con número de registro 080558457, ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado: DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ACIDO DELTA-AMINOLEVULINICO DESHIDRATASA EN TRABAJADORES LABORALMENTE EXPUESTOS AL PLOMO.

Asimismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considerando que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo y no encontrando ningún inconveniente para que se imprima, por lo que pido a Usted permita se realicen los tramites correspondientes para el examen correspondiente.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle mis más cordial saludo, quedando de Usted como su S. S.

A T E N T A M E N T E



Q.F.B. Adolfo Cardenas Ortega
Director de Tesis

Guadalajara, Jal. 27 de Febrero de 1989.

FE DE ERRATAS

PAG. 52 DONDE DICE: ACEPTABLE
DEBE DECIR: PELIGROSA

PAG. 53 DONDE DICE: EXCESIVA (150 ug /100g)
DEBE DECIR : PELIGROSA (120 ug /100 g)

DONDE DICE: ACEPTABLE
DEBE DECIR: PELIGROSA