

7229



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

UTILIDAD DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDRATASA
DEL ACIDO DELTA AMINO LEVULINICO COMO INDICA-
DOR DE ELEVADA EXPOSICION NO LABORAL A PLOMO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

PATRICIA LARA FERZULI



México, D. F.



1990

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	PAGINAS
I.- INTRODUCCION	1 - 23
II.- OBJETIVOS	24
III.- METODO	25 - 36
IV.- RESULTADOS	37 - 46
V.- CONCLUSIONES	47 - 54
VI.- ANEXO I	55 - 60
VII.- ANEXO II	61 - 64
VIII.- BIBLIOGRAFIA	65 - 70

I N T R O D U C C I O N

El plomo es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza; debido al indiscriminado uso de sus derivados, su concentración en la actualidad ha tomado cifras -- alarmantes en el medio ambiente.

Las principales fuentes de contaminación son dos, la primera procede de la industria, durante la purificación y el empleo de sus diferentes compuestos; los más importantes desde el punto de vista industrial se presentan en la tabla número uno. La segunda fuente de importancia está constituida por la combustión de gasolinas que emplean derivados de plomo como antidetonante, para incrementar la eficiencia de los vehículos automotores. A pesar de numerosas investigaciones, hasta la fecha no se tiene evidencia incontrovertible de que el plomo sea nocivo a las concentraciones actuales en el medio ambiente, de modo que se justifique restringir se veramente su empleo; sin embargo, se tienen sospechas de que el plomo es capaz de producir una amplia gama de efectos biológicos, los cuales se encuentran en las Tablas 2 y 3. Por lo que es de importancia estudiar los efectos biológicos del plomo a las concentraciones ambientales actuales y a las esperadas en las próximas -

décadas, si se continúa con su uso irracional, de tal manera que se puedan establecer los límites máximos permisibles en el ambiente urbano.

Se ha observado que los niños, hijos de madres residentes en nuestra ciudad, que durante el primer día de vida excretan plomo en orina, presentan modificaciones en los potenciales evocados visuales y auditivos (62), dada la gravedad que tiene el daño sobre el sistema nervioso central es necesario realizar estudios para precisar si éstas observaciones constituyen indicios tempranos de daño al recién nacido expuesto al plomo contaminante del ambiente urbano durante el embarazo. Sin embargo, para lograr ésta evaluación a más corto plazo y a menor costo es conveniente contar con un método de detección validado con el que sea posible seleccionar a las madres en quienes sea más probable la existencia de concentraciones de plomo que impliquen mayor riesgo para el niño; el método debe ser de bajo costo y sencillo de manera que pueda ponerse a disposición de las madres residentes en áreas de alto riesgo.

En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo se logró la identificación de factores y estados de salud entre quienes existen diferencias en la probabilidad de presentar concentraciones sanguíneas de - -

T A B L A 2

EFECTOS BIOLÓGICOS ATRIBUIDOS AL PLOMO

Captación de yodo por el tiroides humano	Sandstead, H. H.	1969
Déficit psicomotriz en niños	Perlstein, M. A.	1966
Síntesis de las cadenas alfa y beta de - las globinas en reticulocitos humanos.	White, J. M.	1972
Alteraciones cromosómicas de linfocitos humanos.	Schwanitz, G.	1970
Teratogénesis en pollos	Gilani, S. H.	1973
Neuropatías en humanos	Barghdassarian, S. A.	1968
Reproducción en humanos	Hildebrand, D. C.	1973
Adenomas y adenocarcinomas renales en - ratas	Mao, P.	1971
Alteración en la síntesis de anticuerpos en ratones	Koller, P. L.	1974
Susceptibilidad a Salmonella Typhimurium en ratón	Hempill	1971

T A B L A 3

ENZIMAS HUMANAS INHIBIDAS POR EL PLOMO

Adenosintrifosfatas.		1967
Deshidratasa del ácido delta-aminolevulínico eritrocítica.	Lichtman H.; Bonsignore D. De Bruin, A.; Nakao, K. Moore, M. R.; Rausa, G. Neiburg, P.; Tola S.	1963-1974
Fosfatas alcalina sérica	Rausa, G.	1969
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa eritrocitaria.	Rausa, G.	1968
Deshidrogenasa succínica de mitocondrias placentarias.	Dawson, E.B.	1969
Heme sintetasa humana.	Chisolm, M.J.	1964

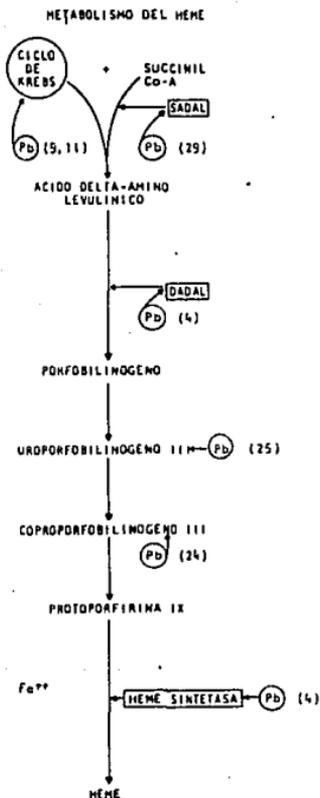
plomo relativamente mayores; por esta razón durante los estudios de validación de los métodos alternativos también es conveniente valorar simultáneamente si los factores y estado de salud, que modifican éstas probabilidades, tienen alguna influencia sobre la utilidad de -- los indicadores.

Señalado el problema que se pretende resolver con el es tudio que se presenta, así como las circunstancias en - que es pertinente realizarlo, se procederá a presentar el análisis de la información que sirvió de fundamento para seleccionar el método indirecto cuya capacidad, pa- ra detectar a las personas con concentraciones relativa- mente altas de plomo, sería conveniente evaluar en pri- mer lugar.

Lógicamente la mejor opción de métodos indirectos po- - dría derivarse de aquellos sistemas biológicos más sen- sibles a la acción del plomo; por ahora existe consenso en afirmar que los efectos biológicos más evidentes y - tempranos se observan en el metabolismo del heme, el -- cual puede ser afectado en varios puntos (Figura 1).

De todas las etapas que constituyen el metabolismo del heme la más sensible y la más estudiada hasta la fecha, respecto a su susceptibilidad al plomo, es la formación de porfobilinógeno (PBG) mediante la condensación de --

FIGURA I



MANIFESTACIONES DETECTABLES EN SANGRE Y ORINA DE LOS EFECTOS DEL PLOMO

Aumento de ADAL en la excreción urinaria (7,12,23)

Disminución de la actividad de DADAL eritrocitaria humana (4,10,15,16,18,19,20,28,31,39)

Aumento de PBG en la excreción urinaria (13,24,27)

Aumento de UPBG III en la excreción urinaria (25)

Aumento de CPBG III en la excreción urinaria (2,34)

Aumento en las protoporfirinas eritrocíticas (13,22)

Inhibición de la actividad de la HEME sintetasa eritrocítica (4)

Disminución de la concentración del grupo HEME eritrocítico

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

Aumento en porfirias incluidas las producidas químicamente, no se conocen otras causas de aumento en la excreción urinaria, pero los estudios están incompletos. (6-A)

El alcohol también disminuye la actividad de DADAL, no se conocen otras causas, pero los estudios están incompletos. (30)

También se observa aumento en la anemia ferropénica y en porfirias incluidas las producidas químicamente pero los estudios están incompletos. (24)

También se observa aumento en la excreción urinaria de UPBG III en las porfirias F. reumáticas, poliomielitis y cirrosis. (17,38)

También se observa aumento en la excreción urinaria de CPBG III en las porfirias F. reumáticas, poliomielitis y cirrosis. (17,38)

También se observa aumento de las protoporfirinas eritrocíticas en las protoporfirias eritropoyéticas, no se conocen otras causas de aumento pero los estudios están incompletos (26,32)

No se conocen otras causas de inhibición pero los estudios están incompletos (14)

En todas las anemias se encuentra disminución del HEME.

dos moléculas de ácido delta amino levulínico (ALA) catalizada por la deshidratasa del ácido delta amino levulínico (DALA).

CATALISIS DE DALA.

La deshidratasa del ácido delta amino levulínico -- (Ec. 4.2.1.24) cataliza la condensación de dos moléculas de ácido delta amino levulínico (ALA) para -- formar el porfobilinógeno (PBG). En esta condensación, la cual es esencialmente una reacción de -- Knorr (Fig. 2) ocurren tres distintas reacciones: - (1) una condensación aldólica, (2) la eliminación -- de agua, tanto del átomo de carbono que lleva el -- grupo hidróxilo, como del átomo de carbono adyacente, y (3) la formación de una base de Schiff por la eliminación de otra molécula de agua entre el grupo carbonilo de una molécula y el grupo amino de la -- otra. Ya que la síntesis es catalizada por una enzima, es de interés comentar la secuencia de mecanismos de las tres reacciones.

Casi simultáneamente se descubrió, por una parte, -- que el ácido delta amino levulínico intermediario en la síntesis de porfirina, es un producto de

la condensación de Succinil - CoA y glicina, y por otra, la estructura de porfobilinógeno aislada previamente por Westall, con ello pudo aclarar que el porfobilinógeno era el intermediario pirrólico desconocido de la síntesis de porfirinas que se suponía resultaba de la condensación de dos moléculas de ácido delta amino levulínico y que a su vez la estructura de porfobilinógeno resultaba de la conversión directa del pirrol a protoporfirina.

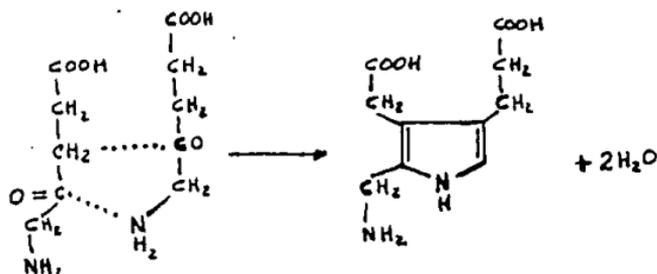


Figura 2. La formación de porfobilinógeno a partir de dos moléculas de ALA.

Después del descubrimiento del ácido delta amino levulínico y la determinación de la estructura de porfobilinógeno se logró la preparación de la enzima --deshidratasa cruda a partir de hígado de buey, y, de eritrocitos de pato y de pollo; se demostró que el --

en bufer de tris pero era activa en bufer de tris fosfato. Posteriores investigaciones revelaron - que el ion requerido era potasio y no el fosfato - (10), después se supuso que también la enzima de - hígado se inactivaba en bufer de tris y que el po- tasio restablecía la actividad. En una reinvesti- gación de los requerimientos de iones potasio so- bre la actividad de ambas enzimas de hígado y de - R. spheroides se encontró que la enzima de hígado no requería iones potasio y que era completamente activa en bufer de tris. Con la enzima de R. - - spheroides se requerían iones potasio para la acti- vidad de la enzima a bajas concentraciones de sus- trato, sin embargo, el sustrato tiene un efecto -- cooperativo homotrópico en la enzima, de modo que existe la actividad enzimática en ausencia de io- nes potasio cuando se incrementa la concentración del sustrato. Los descubrimientos con la enzima de hígado permitieron sospechar el posible papel - de los iones metálicos en la actividad catalítica de esta enzima, esta consideración muestra que el EDTA inhibe la enzima obtenida de eucariotes y le- vaduras pero no la de células bacterianas, con - - excepción de una enzima obtenida de un nuevo mutan- te descubierto de R. spheroides.

PROPIEDADES CATALITICAS:

VALORACION

La actividad de la enzima se determina midiendo la cantidad de porfobilinógeno formado después de la adición del reactivo de Ehrlich -(p-dimetilaminobenzaldehído) disuelto en ácido acético y perclorico--calculado al medir la absorción a 555nm. Ya que los compuestos SH interfieren con la determinación, se agrega cloruro de mercurio (0.1M) en el ácido --tricloroacético que se añade para detener la reac--ción enzimática (44).

CINETICA

Aunque las enzimas de diferentes fuentes no tienen el mismo grado de pureza, el análisis de datos publicados revela que las actividades específicas de la enzima varían ampliamente; las enzimas de los sistemas de fotosíntesis bacteriana son más acti--vas que las obtenidas de los organismos eucarióti--cos. La enzima de hígados de feto de ratón es --dos veces más activa que la enzima de hígado de --

ratón adulto.

Son similares los valores de K_m obtenidos con diferentes preparaciones y, con excepción de la enzima del R. spheroides, se obtiene una curva de saturation de forma hiperbólica, al graficar la actividad enzimática observada con diferentes concentraciones del sustrato.

Una curva similar también se obtiene con la enzima del R. spheroides, pero en presencia de iones potasio (44). Sin embargo, en ausencia de iones potasio, con esta enzima se obtiene una curva sigmoidal demostrándose con ello el efecto cooperativo homotrópico del sustrato, pero la velocidad máxima obtenida con una concentración de sustrato de 0.05 M. equivale a la mitad de la encontrada con la presencia de iones potasio.

La cinética en la presencia de iones sodio es también algo diferente de la encontrada con iones potasio. La activación causada por iones sodio correspondiente al 50% que la encontrada para los -- otros metales alcalinos (44).

NATURALEZA DE LOS SITIOS ACTIVOS

De la consideración de los mecanismos de reacción -- que involucran la formación de la base de Schiff en -- tre la enzima y el sustrato, y a partir de las ob-- servaciones de que el éster de ALA no está unido -- esencialmente a la enzima, y, al hecho de que mien-- tras el ácido levulínico forma una base de Schiff -- con la enzima, el cetoglutarato no lo hace así -- (Fig. 3), fué posible sugerir tentativamente cier-- tos rasgos del sitio de acción requerido para la -- acción catalítica. (Fig. 4).

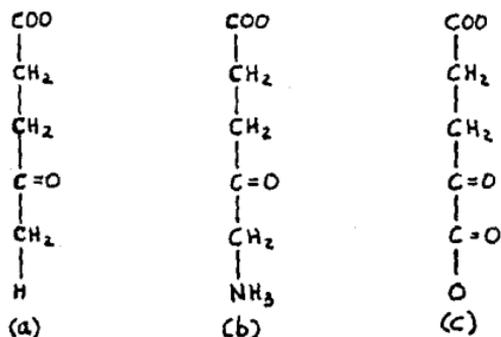


Figura 3.- Comparación de estructuras de algunos -- γ -cetofácidos: (a) ácido levulínico, (b) ácido -- delta amino levulínico, y (c) ácido cetoglutarico.

De la inactivación de la enzima por NaBH_4 , la reducción que ocurre solamente en la presencia del sustrato o de compuestos relacionados, y, de la formación de proteínas radiactivas en la reducción de la enzima en la presencia de C-marcado ALA se derivó la existencia de un grupo NH_2 .

La formación de una base de Schiff entre el sustrato y la enzima resulta en la formación de un carbanión estabilizado, el cual puede efectuar un ataque nucleofílico en el átomo de carbono de la segunda molécula (Fig. 6). Esto es consistente con el mecanismo de catálisis por aldolasa y con aminocatalisis de la condensación aldólica. Existe un grupo básico sobre el grupo NH de la proteína para ayudar a la extracción de un protón en la formación del carbanión. La presencia de un grupo cargado positivamente se derivó de la observación por una parte de que el éster de ALA no funciona como sustrato a las concentraciones usualmente empleadas, y por otra, que tanto el ácido levulínico como sus ésteres forman la base de Schiff con la enzima, y que únicamente los ácidos libres actúan como un inhibidor competitivo. Estos descubrimientos mostraron que el grado de afinidad al sustrato está -

determinado tanto por la facilidad de la formación de la base de Schiff, como por la formación de una unión iónica entre un grupo de carga positiva de la enzima y el ion carboxilato en posición B respecto al grupo carbonilo del sustrato. (Fig. 4)

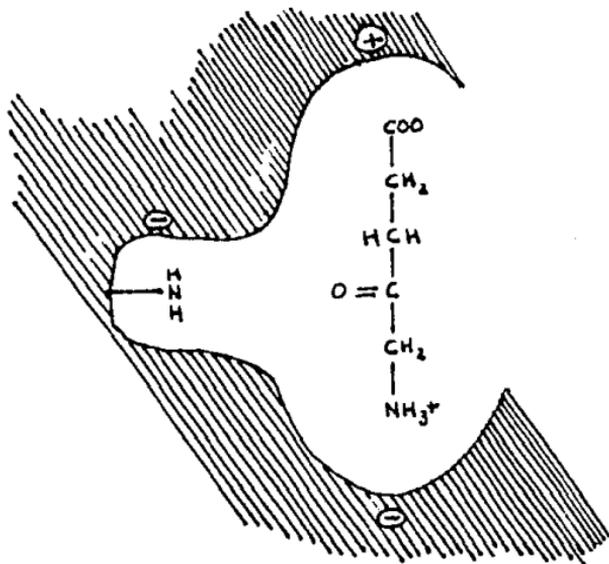


Figura 4. Características del "Sitio activo" de la enzima.

La existencia de este grupo cargado positivamente -- ubicado estratégicamente en la enzima, incrementa la afinidad de el γ -ceto ácido a la enzima y orienta la molécula de tal manera que permite que se forme PBG y no un isómero. Si solamente se activa el átomo

de carbono del metileno de arriba de la base de Schiff en la ausencia de un grupo orientador se forma un pirrol isomérico con un ácido propiónico en la cadena lateral en posición α y un grupo amino y uno propiónico en posición B (Fig. 5).

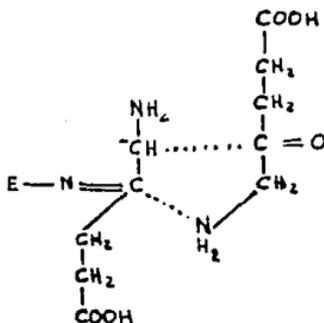


Figura 5.- Formación del isómero de PBG.

La existencia de un segundo grupo negativo surgió de la observación de que el cetoglutarato, el cual contiene un grupo carboxilo en lugar del grupo metil amino del ALA, no puede ser reducido en la enzima con NaBH_4 .

MECANISMO DE LA SINTESIS DE PORFOBILINOGENO.

Cuando se supuso que la deshidratasa del ácido - -

delta amino levulínico, cataliza la síntesis de -- porfobilinógeno a partir de dos moléculas de ácido delta amino levulínico, surgieron las siguientes - preguntas en relación al mecanismo de reacción pro- puesto: a).- La condensación aldólica y la forma- ción de la base de Schiff ¿son catalizadas por la - enzima? b).- Si solamente la condensación aldóli- ca es catalizada por la enzima, la formación de la base de Schiff ¿tiene lugar antes o después de la condensación? c).- Si ambas reacciones son cata- lizadas por una enzima, ¿cuál de las dos reaccio- nes ocurre inicialmente? d).- Si la condensación aldólica ocurre inicialmente la deshidratación en- tre los dos átomos de carbono ocurre ¿antes o des- pués de la formación de la base de Schiff?.

El descubrimiento de que el sustrato forma una ba- se de Schiff con la enzima sugirió que el siguien- te es el mecanismo para la formación del pirrol el cual es consistente con los datos y las interroga- nes presentadas.

La formación por el sustrato de la base de Schiff con la enzima resulta en un carbanión estabilizado, el cual puede hacer un ataque nucleofílico del - -

carbonilo de una segunda molécula, y, con esto, impide la formación inicial de una base de Schiff entre dos moléculas de sustrato; porque de ser así el sustrato no podría tener una unión de base Schiff con la enzima. Después de la condensación aldólica la enzima cataliza la eliminación de agua entre el carbono que lleva el grupo hidroxilo recién formado y el átomo de carbono adyacente.

De un ataque nucleofílico del grupo amino del ácido delta amino levulínico II sobre el átomo de carbono altamente reactivo de la molécula I en unión base de Schiff con la enzima resulta en la formación de una diamina. El grupo amino de la enzima es el grupo que se separa, se forma un pirrol que tiene un sistema conjugado y por ello ya no es capaz de reaccionar con la enzima. De este modo, la formación de pirrol por transaminación es como una especie de trampa que dirige la reacción de izquierda a derecha, y es un mecanismo que permite la liberación del producto del sitio activo de la enzima. Así, en el mecanismo, existen tres distintas reacciones que son catalizadas por una sola enzima.

En el porfobilínógeno sintetizado a partir de dos -

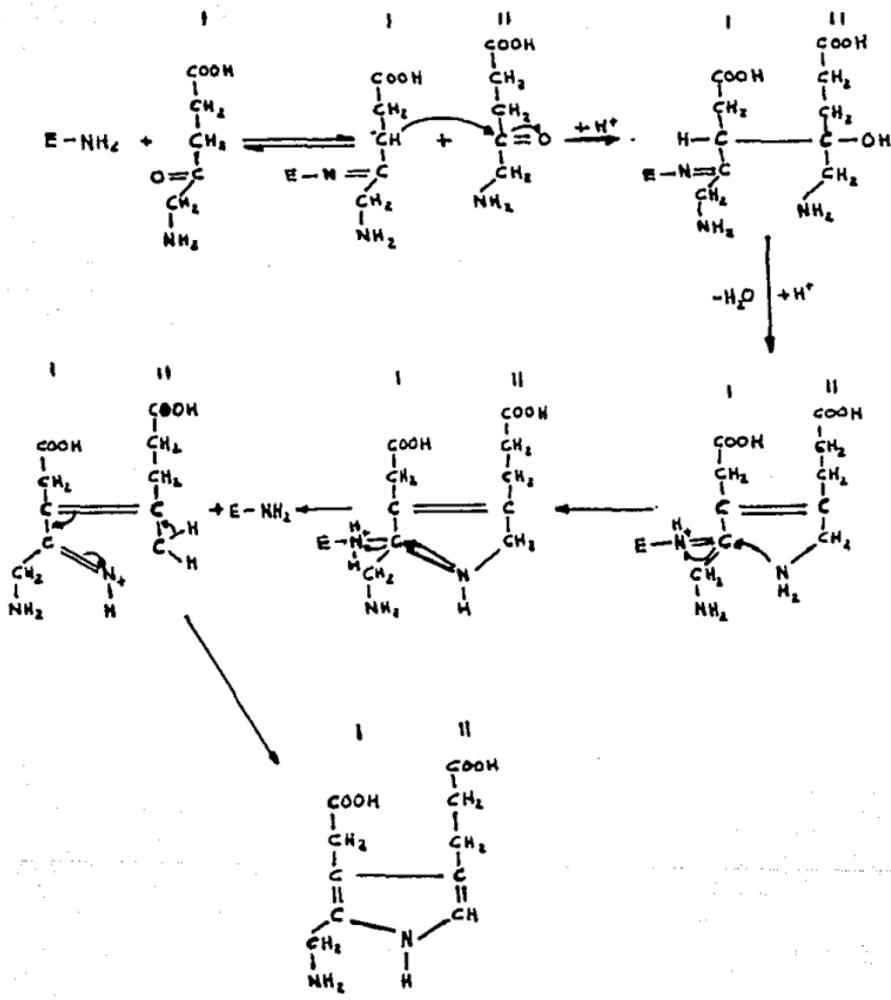


Figura 6. Mecanismo de la síntesis de porfobilinógeno a partir de dos moléculas de ácido delta amino levulínico.

moléculas de ácido delta amino levulínico, el lado que lleva la cadena lateral de ácido acético en la posición beta del pirrol es la molécula que estaba unida a la enzima mediante un enlace covalente de base Schiff, y la molécula que da origen al lado -- que lleva la cadena lateral de ácido propiónico -- proviene de un sitio unido a otra parte (Fig. 7).

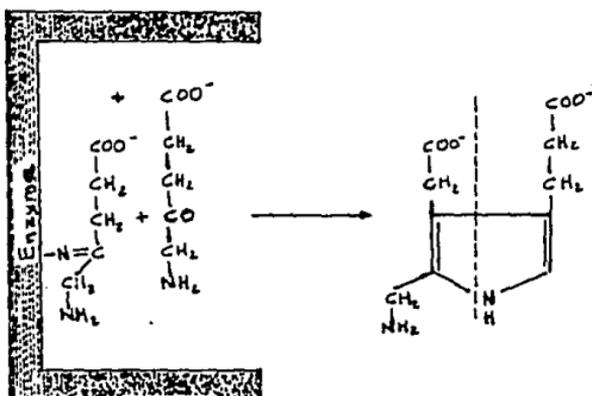


Figura 7. Diferencias en lo que ocurre con las dos moléculas de ácido delta amino levulínico.

Desde el punto de vista práctico, el estado funcional de la formación del porfobilinógeno puede estudiarse -- mediante la determinación de la actividad de la deshidratasa del ácido delta amino levulínico y/o --

mediante el estudio de la excreción del ácido delta amino levulínico, sin embargo, este último medio no es la mejor opción debido a que se ve afectado por los innumerables y frecuentes factores que afectan la concentración de los solutos en la orina, independientemente de que también se modifica por el alcohol, el tabaco, y de que presenta cambios circadianos (49).

Por esta razón el estudio de DALA, aunque relativamente más complicado que el estudio de ALA, parecería ser la opción que tiene más probabilidades de ser útil para el propósito señalado anteriormente.

A pesar de la gran cantidad de estudios efectuados (26, 33, 38, 54, 56), en ninguno de ellos se ha determinado la probabilidad de error que tiene un determinado valor "X" de DALA para indicar la existencia de una concentración "Y" de plomo entre personas sin exposición laboral a plomo; menos aún en embarazadas, por lo que es indispensable efectuar un estudio para valorar si las determinaciones de DALA tienen un error, que por ser bajo, permita su empleo en la detección de sujetos con concentraciones relativamente altas de plomo

Al efectuar la revisión bibliográfica de diferentes --

opciones para cuantificar la actividad de DALA en eritrocito humano, se encontró que existen varias técnicas (9, 30, 31, 33), todas ellas derivadas del método de Bonsignore C. (5, 6), en el que se evalúa en unidades arbitrarias la actividad de la enzima, derivada a su vez de las variaciones en la densidad óptica corregidas en función del tiempo, del hematocrito y de la dilución empleada.

Dadas las variaciones de las condiciones empleadas por los diferentes autores, en un proyecto efectuado con antelación a este estudio, se evaluó el efecto que sobre la actividad enzimática --observada como se describió previamente-- tenía el pH, la concentración de --sustrato, la temperatura de incubación, el tiempo y el bufer empleado; a partir de este estudio se identificaron las condiciones en las que es posible obtenga la máxima actividad enzimática. Con el fin de hacer comparables las observaciones de este estudio, para el desarrollo de este proyecto se decidió mantener las condiciones en las que se obtuvo la máxima actividad enzimática, la que por otra parte son similares a las descritas por Helen B. Burch (9). Precisadas las técnicas a emplear, y por las razones señaladas con anterioridad, se decidió llevar a cabo un proyecto de investigación interdisciplinario con los siguientes objetivos:

O B J E T I V O S

Conocer las exactitudes indicativas positivas de la actividad de DALA en eritrocitos de mujeres embarazadas - residentes en la ciudad de México, sin exposición laboral al plomo.

Conocer la exactitud indicativa negativa de la actividad de DALA en eritrocitos de mujeres embarazadas residentes en la ciudad de México, sin exposición laboral al plomo.

Conocer las exactitudes indicativas observadas en los grupos con distintos estados de salud que se ha observado, modifican la probabilidad de presentar concentraciones elevadas de plomo.

M E T O D O

Las personas incluidas en el estudio, se captaron mediante dos estrategias. El primer grupo estuvo constituido por personas adultas residentes en la ciudad de México, las que no habían presentado enfermedad alguna en el curso del último mes y fueron detectadas durante otros estudios a nivel de comunidad (40); a estas personas se les explicó el propósito del estudio y se les invitó a participar en el mismo. A los que aceptaron se les efectuó estudio clínico sistematizado para verificar que no tuvieran indicio de algún proceso patológico en evolución; se les solicitó que durante una semana hicieran un registro de hábitos y exposición a factores sospechosos de alterar las concentraciones de plomo, particularmente en el uso de: insecticidas, bebidas alcohólicas, pasta de dientes, aerosoles, cigarro ambiental, cigarro personal, medicamentos, gas, tráfico normal, tráfico embotellamiento, asado al carbón, latería, barro vidriado y pica; para ello se les proporcionaron hojas de registro. Al cabo de los 5 días, se les recabaron especímenes de sangre durante las primeras horas de la mañana. Con estas personas se conformó el grupo "A" o de "PERSONAS SANAS SIN EMBA
RAZO".

El segundo grupo de personas participantes se captó en la sala de toma de muestras de un laboratorio del sistema asistencial en el que propositivamente se buscaron mujeres embarazadas, pacientes ya sea con problemas hepáticos o renales; y, pacientes con problemas agudos frecuentes en nuestro medio. A este último grupo de personas, se les efectuó estudio clínico para verificar que se tratara de pacientes con enfermedades que no fueran de origen hepático o renal y que no cursaran con, en caso de ser mujeres, embarazo; con ellas se conformó el grupo "B" o de "PERSONAS CON ENFERMEDADES QUE NO MODIFICAN PLOMO" y a todas ellas también se les recabaron especímenes en las primeras horas de la mañana y se les interrogó sobre sus hábitos y posibles exposiciones a factores de riesgo durante los días precedentes.

En cuanto a las mujeres embarazadas, mediante un chequeo clínico, se verificó que se tratara de mujeres embarazadas sanas y sin complicaciones; con estas mujeres se formó el grupo "C" o de "EMBARAZADAS SANAS" y se procedió en la misma forma que el grupo anterior. Por último, se formó el grupo "D" o de "PERSONAS CON ENFERMEDADES QUE INCREMENTAN LAS CONCENTRACIONES DE PLOMO", verificando que los pacientes efectivamente --

cursaran con un problema hepático o renal y se procedió en la misma forma que con los grupos anteriores.

Las muestras se trasladaron al laboratorio de la unidad de Investigación del ISSSTE y se procesaron en el curso de la primera hora después de la toma; se cuantificó la actividad de la deshidratasa del ácido delta - amino levulínico (DALA), en sangre y la concentración de plomo sanguíneo.

La cuantificación de plomo se efectuó con el espécimen recabado en tubos, que habían sido lavados cuidadosamente con solución de ácido nítrico y habían sido secados en horno. La cuantificación de la actividad de la Deshidratasa del Acido Delta Amino Levulínico se efectuó con el espécimen recabado en tubos, los cuales habían sido lavados con ácido nítrico diluido y enjuagados con agua destilada y secados en horno.

"Determinación de Plomo en Sangre por Espectroscopía de Absorción Atómica. Por el método de Hessel" (31).

FUNDAMENTO

El método, basado en la técnica de quelación, involucra

la hemólisis de la sangre con una solución de tritón - X-100, el metal liberado es quelado con pirrolidín ditiocarbamato de amonio, y extraídos posteriormente por medio del solvente isobutil metil cetona, este extracto se analiza en un espectrofotómetro de absorción atómica.

Una lámpara de cátodo hueco para plomo, produce luz de longitud de onda característica, esta luz pasa a través de la flama donde se inyecta a presión la muestra y los átomos de plomo la absorben debido al principio básico de física cuántica. La diferencia de la intensidad de la luz que atraviesa la flama antes y después de la introducción de la muestra, es proporcional a la concentración de plomo en ella.

Reactivos:

- Solución stock de plomo de 1000 mcg/ml.
- Solución estándar de plomo de 10 mcg/ml.
- Pirrolidín ditiocarbamato de amonio al 2% (p/v).
- Tritón X-100 al 5% (v/v).
- Metil isobutil cetona (saturada en agua).

Procedimiento:

Se pesaron tubos heparinizados de 16 x 150 mm con tapón de rosca y se les agregaron de 6 a 8 ml de sangre. Se pesaron nuevamente los tubos y por diferencia se estableció el peso de la muestra. Se añadió 1 ml. de tritón X-100, 1ml. de pirrolidín ditiocarbamato de amonio y 5 ml. de metil isobutil cetona.

Se agitaron vigorosamente los tubos con muestra y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min., para separar el extracto de la sangre.

Se utilizó un blanco de metil isobutil cetona saturada en agua para poner el cero del espectrofotómetro de absorción atómica, ajustando a las siguientes condiciones:

Longitud de onda	283.3 nm
Abertura de paso de luz	0.7 nm
Fuente de energía	Lámpara de cátodo hueco para plomo
Tipo de flama	Aire-acetileno (Oxidante)

Curva de calibración

Para efectuar la curva de calibración, se colocaron 5 g de sangre en doce tubos divididos en cuatro series de tres tubos cada una: A cada serie se le agregó la solución estándar necesaria para alcanzar concentraciones de plomo de 0, 30, 60, y 100 mcg/100 g.

Tubos con 5 g de sangre		Solución estándar de 10 mcg/ml.	Concentración mcg/100 g
No.	n	ml	
1	(3)	0	0
2	(3)	0.15 (1.5 mcg totales)	30
3	(3)	0.30 (3.0 mcg totales)	60
4	(3)	0.50 (5.0 mcg totales)	100

ANALISIS

Se analizó, en el espectrofotómetro de absorción atómica, la fase orgánica, de los problemas y el estándar de 5 mcg., extraída en forma similar a los problemas.

Cálculos

$$\text{Pb-S (mcg/100g)} = \frac{\text{mcg en la muestra}}{\text{g de muestra}} \times 100$$

*Otra técnica se describe en el Anexo I

"Determinación de la actividad de la Deshidratasa del -
Acido Delta Amino Levulínico"(9)

FUNDAMENTO

La actividad de la enzima se determina en unidades --
convencionales midiendo las diferencias en absorbancia
medidas a 555 nm obtenidas después de incubar el espécimen,
de detener la actividad enzimática con ácido --
tricloroacético, y de desarrollar color con la adición
del reactivo de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldehído) -
disuelto en ácido acético y perclórico. Ya que los --
compuestos SH, abundantes en las muestras sanguíneas -
pueden modificar la determinación, se adiciona cloruro
de mercurio (0.1M) en el ácido tricloroacético emplea-
do para parar la reacción enzimática.

REACTIVOS

- Tritón X-100
- Bufer ALA sustrato
- TCA (N-etilmaleimida al 10%)
- Ehrlich modificado
- Anticoagulante

Procedimiento

La sangre extraída por venipuntura, se coloca en tubos heparinizados y previamente lavados como ya se indicó, se usa una alícuota para la determinación del hematocrito.

Preparación de la mezcla de incubación. Se añaden 0.2 ml. de sangre a 1.30 ml de tritón X-100, lo que asegura la hemólisis inmediata, se agrega 1 ml de bufer ALA sustrato y se mezcla. Se remueve inmediatamente 1 ml de la mezcla para el blanco y se añade rápidamente a un tubo conteniendo 1 ml. del TCA. Después de mezclar y centrifugar, se remueve 1 ml del fluido supernadante claro para desarrollar en él la reacción colorida. Se cubren los tubos conteniendo el resto de la mezcla de incubación (1.5 ml) y se incuban a 38 grados C por una hora, después de este tiempo, se añaden 1.5 ml de TCA a los tubos de incubación. Después de mezclar y centrifugar se toma un ml del fluido supernadante claro para desarrollar la reacción colorida; para ello a cada una de las alícuotas del blanco y prueba del fluido supernadante se añade 1 ml del reactivo de Ehrlich modificado, se mezcla la solución y se permite el desarrollo del color por 13 min. Se leen las absorbancias

a 555 nm dentro de los próximos 10 min., en un espectro fotómetro usando celdas de 1 cm.; se hace un blanco de reactivos para ajustar el equipo a 0.00%.

CALCULOS

La diferencia en absorbancia DA se obtiene al restar la absorbancia de las pruebas AP a la absorbancia de los blancos AB: $DA = DB - DP$.

$$AD = \frac{DA \times 100}{ht} \times 12.5 \times 10 \text{ o'}$$

Al simplificar la fórmula queda:

donde 12.5 es el factor de dilución de la sangre; y ht es el hematocrito

$$AD = \frac{DA \times 12,500}{ht}$$

Las unidades de actividad enzimática están expresadas en función de la DA obtenido a 555 nm, con una celda de 1.0 cm., por ml de eritrocito, por hora, a 38 grados Centígrados.

Una vez obtenidas las actividades de DALA y las concen traciones de plomo, se procedió al cálculo de las exac titudes indicativas positivas (EIP) y negativas (EIN) (20); como es sabido, la EIP corresponde al valor de - la probabilidad de acertar que tiene el método indirec to (DALA) al indicar que el sujeto tiene plomo alto -- (\uparrow 15 ó \uparrow 25), cuando se observa el valor indicativo (\uparrow 200 ó \uparrow 300) en un sujeto dado. Es la respuesta a la pregunta: ¿Cuándo una persona tiene dala \uparrow 200 -- (ó \uparrow 300), qué probabilidad existe de que efectivamen te tenga plomo sanguíneo \uparrow 15 (ó \uparrow 25)?.

La EIN corresponde al valor de la probabilidad de acier to que tiene el método indirecto (DALA) al señalar que el sujeto no tiene plomo alto (\downarrow 15 ó \downarrow 25) cuando - en esa persona no se encuentra la actividad de DALA -- con el valor indicativo, en este caso \downarrow 200 ó \downarrow 300.

La EIN es la respuesta a la pregunta que se hace el -- usuario del método.

¿Ya que ésta persona no tiene dala \downarrow 200 (ó \downarrow 300) que probabilidad existe de que en realidad no tenga plomo sanguíneo \downarrow 15 (ó \downarrow 25)?

Los EIP y la EIN se obtuvieron con el empleo de las si guientes fórmulas (20)

$$EIP = \frac{a}{a+b}$$

$$EIN = \frac{d}{c+d}$$

donde:

a = número de positiva real

b = número de falsa negativa

c = número de falsa positiva

d = número de negativa real

		CONDICION	
		CONFIRMADA	
		Positiva	Negativa
RESULTADO DE LA PRUEBA	positiva	a	b
	negativa	c	d

para ello se consideró como "Condición Confirmada Positiva" a la observación en la persona estudiada, para un análisis, de una concentración de plomo ≥ 15 mcg/100 ml. y, para otro análisis de una concentración de plomo ≥ 25 mcg/100 ml. Como "Condición confirmada negativa" se consideró a la observación de concentraciones de plomo ≤ 15 mcg/100 ml. y ≤ 25 mcg/100 ml. respectivamente.

Como "Prueba en estudio positiva" para un análisis se consideró a la observación de actividad de DALA ≥ 200 U., para otro la observación de ≥ 300 U., de DALA; y - como "Prueba en estudio negativa" a la observación de DALA ≤ 200 U., o de 300 U., respectivamente.

Mediante este procedimiento se calcularon las exactitudes indicativas positivas y negativas correspondientes al total de observaciones, y a los grupos de individuos estudiados; se efectuaron comparaciones de las observaciones realizadas en los distintos grupos, tanto para concentraciones de plomo ≥ 15 y ≥ 25 como para niveles de actividad de DALA de ≤ 200 U. y 300 U.

Los contrastes estadísticos se efectuaron mediante la prueba de χ^2 con corrección de Yates (61).

RESULTADOS

Se estudiaron a un total de 268 personas de las cuales 110 fueron sanas sin embarazo, 60 embarazadas, 70 con enfermedades que no modifican el plomo sanguíneo y 28 con procesos patológicos que tienen probabilidad de -- modificar el plomo sanguíneo. Se presenta por separado los resultados de cada grupo, en primer lugar respecto a la identificación de personas con plomo sanguíneo elevado.

"Detección de personas con mayor probabilidad de plomo sanguíneo elevado".

En cada grupo se evaluó la utilidad de dos niveles de actividad de DALA ≤ 200 U. y ≤ 300 U. para identificar a personas ya sea con plomo sanguíneo ≥ 15 mcg/100 ml o ≥ 25 mcg/100 ml.

EMBARAZADAS SANAS: Los resultados de este grupo se - presentan en el cuadro (1), como ahí puede verse, la - observación de DALA ≤ 200 U., en una paciente embarazada se asoció a una probabilidad de 0.7272 de que esa paciente tuviera además una concentración sanguínea de plomo ≥ 15 mcg/100 ml.; en las pacientes embarazadas -

en cuya sangre se observó una actividad de DALA ≤ 300 U. se encontró que existe una probabilidad de 0.4545 de que esa paciente tenga plomo sanguíneo ≥ 15 mcg/100 ml.

Por otra parte si la paciente embarazada no tiene en su sangre una actividad de DALA ≤ 200 U., se encontró -- que existe una probabilidad de 0.4286 de que no tenga -- una concentración de plomo en sangre ≥ 15 mcg/100 ml.; y, si la embarazada no tiene una actividad de DALA ≤ 300 U., tiene una probabilidad de sólo 0.3158 de que no tenga plomo sanguíneo ≥ 15 mcg/100 ml.

Por lo que respecta a la identificación de embarazadas con una concentración de plomo sanguíneo ≥ 25 mcg/100 ml., se observó que existe una probabilidad de 0.2727 de que la paciente tenga ese nivel de plomo si se le -- observa una actividad de DALA ≤ 200 U.; si esta última es ≤ 300 U., la probabilidad de que tenga el nivel de plomo mencionado disminuye a 0.1818; pero si la paciente no tiene una actividad de DALA ≤ 200 U., existe una probabilidad de 0.8775 de que no tenga plomo -- sanguíneo ≥ 25 mcg/100 ml.; una probabilidad semejante a 0.8684 existe de que no tenga estos niveles de -- plomo si no se observa una actividad de DALA ≤ 300 U.

EXACTITUDES INDICATIVAS DE LA ACTIVIDAD DE DALA EN MUJERES EMBARAZADAS SANAS

ACTIVIDAD DE DALA	DETECCION DE SUJETOS CON PLOMO SANGUINEO 15 mcg/100 ml.		DETECCION DE SUJETOS CON PLOMO SANGUINEO 25 mcg/100 ml.	
	PARA AFIRMARLO *	PARA DESCARTARLO **	PARA AFIRMARLO +	PARA DESCARTARLO ++
200 U.	0.7272	0.4285	0.2727	0.8777
300 U.	0.4545	0.3157	0.1818	0.8684

CUADRO No. 1

- *: La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona tenga plomo ≥ 15 - al encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300
- ** : La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona no tenga plomo ≥ 15 - al no encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300
- +: La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona tenga plomo ≥ 25 - al encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300
- ++: La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona no tenga plomo ≥ 25 - al no encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300

PERSONAS SANAS SIN EMBARAZO: La observación de actividad de DALA ≤ 200 U., en una persona sana no embarazada se asoció a una probabilidad de 0.6000 de que esa persona tuviera además una concentración sanguínea de plomo ≥ 15 mcg/100 ml.; en las personas sanas cuya sangre observa una actividad de DALA ≤ 300 U. se encontró que existe una probabilidad de 0.6667 de que estas personas tengan plomo sanguíneo ≥ 15 mcg/100 ml. (Cuadro 2).

Por otra parte si las personas sanas no embarazadas no tienen en su sangre una actividad de DALA ≤ 200 U., se encontró que existe una probabilidad de 0.3000 de que no tenga una concentración de plomo en sangre ≥ 15 mcg/100 ml., y si la persona no tiene una actividad de DALA ≤ 300 U. tiene una probabilidad de sólo 0.3684 de que no tenga plomo sanguíneo ≥ 15 mcg/100 ml.

Por lo que respecta a la identificación de personas sanas no embarazadas con una concentración de plomo sanguíneo ≥ 25 mcg/100 ml. se observó que existe una probabilidad de 0.2400 de que las personas tengan ese nivel de plomo, si se les observa una actividad de DALA ≤ 200 U.; si esta última es ≤ 300 U., la probabilidad de que tenga el nivel de plomo mencionado disminuye a

EXACTITUDES INDICATIVAS DE LA ACTIVIDAD DE DALA EN PACIENTES SANOS

ACTIVIDAD DE DALA	DETECCION DE SUJETOS CON PLOMO SANGUINEO 15 mcg/100 ml.		DETECCION DE SUJETOS CON PLOMO SANGUINEO 25 mcg/100 ml.	
	PARA AFIRMARLO*	PARA DESCARTARLO**	PARA AFIRMARLO+	PARA DESCARTARLO++
200 U.	0.6000	0.3000	0.2400	0.7833
300 U.	0.6666	0.3684	0.2702	0.8611

CUADRO No. 2

- *: La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona tenga plomo ≥ 15 -
al encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300
- ** : La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona no tenga plomo
 ≥ 15 - al no encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300
- +: La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona tenga plomo ≥ 25
25 - al encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300
- ++ : La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona no tenga plomo
 ≥ 25 - al no encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300

0.2703 pero si las personas no tienen una actividad de DALA \leq 200 U., existe una probabilidad de 0.7833 de -- que no tenga plomo sanguíneo \geq 25 mcg/100 ml.; una probabilidad de 0.8611 existe de que no tenga estos niveles de plomo si no se observa una actividad de DALA \leq 300 U.

PERSONAS CON ENFERMEDADES QUE MODIFICAN PLOMO. La observación de actividad de DALA \leq 200 U., en un paciente enfermo que modifica plomo se asoció a una probabilidad de 1.0000 de que ese paciente tuviera además una concentración sanguínea de plomo \geq 15 mcg/100 ml.; en los pacientes que modifican plomo en cuya sangre se -- observa una actividad de DALA \leq 300 U., se encontró -- que también existe una probabilidad de 1.0000 de que -- ese paciente tenga plomo sanguíneo \geq 15 mcg/100 ml. - Cuadro (3).

Por otra parte, si el paciente que modifica plomo no -- tiene en su sangre una actividad de DALA \leq 200 U., se encontró que existe una probabilidad de 0.0588 de que no tenga una concentración \geq 15 mcg/100 ml.; y si el -- paciente no tiene una actividad de DALA \leq 300 U., tiene una probabilidad de sólo 0.0625 de que no tenga plomo sanguíneo \geq 15 mcg/100 ml.

EXACTITUDES INDICATIVAS DE LA ACTIVIDAD DE DALA EN PACIENTES
CON ENFERMEDADES QUE ELEVAN LAS CONCENTRACIONES DE PLOMO

ACTIVIDAD DE DALA	DETECCION DE SUJETOS CON PLOMO SANGUINEO 15 Mcg/100 ml.		DETECCION DE SUJETOS CON PLOMO SANGUINEO 25 mcg/100 ml.	
	PARA AFIRMARLO*	PARA DESCARTARLO**	PARA AFIRMARLO+	PARA DESCARTARLO++
200 U.	1.0000	0.0588	0.8888	0.5263
300 U.	1.0000	0.0625	0.8333	0.5625

CUADRO No. 3

- *: La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona tenga plomo → 15 - al encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300
- ** : La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona no tenga plomo √ 15 - al no encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300
- +: La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona tenga plomo → 25 - al encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300
- ++ : La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona no tenga plomo √ 25 - al no encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300

Por lo que respecta a la identificación de enfermos que modifican plomo con una concentración de plomo sanguíneo ≥ 25 mcg/100 ml.; se observó que existe una probabilidad de 0.8888 de que el paciente tenga ese nivel de concentración de plomo si se le observa una actividad de DALA ≤ 200 U.; si esta última es ≤ 300 U. la probabilidad de que tenga el nivel de plomo mencionado disminuye a 0.8333, pero si el paciente no tiene una actividad de DALA ≤ 200 U. existe una probabilidad de 0.5263 de que no tenga plomo sanguíneo ≥ 25 mcg/100 ml.; una probabilidad semejante a 0.5625 existe de que no tenga estos niveles de plomo si no se observa una actividad de DALA ≤ 300 U.

PERSONAS CON ENFERMEDADES QUE NO MODIFICAN PLOMO: La observación de actividad de DALA ≤ 200 U. en un paciente enfermo que no modifica plomo se asoció a una probabilidad de 0.7500 de que ese paciente tuviera además -- una concentración sanguínea de plomo ≥ 15 mcg/100 ml.; en los pacientes que no modifican plomo en cuya sangre se observa una actividad de DALA ≤ 300 U. se encontró que también existe una probabilidad de 0.8286 de que -- ese paciente tenga plomo sanguíneo ≥ 15 mcg/100 ml. (Cuadro 4).

EXACTITUDES INDICATIVAS DE LA ACTIVIDAD DE DALA EN PACIENTES
CON ENFERMEDADES QUE NO ELEVAN CONCENTRACIONES DE PLOMO

ACTIVIDAD DE DALA	DETECCION DE SUJETOS CON PLOMO SANGUINEO 15 mcg/100 ml.		DETECCION DE SUJETOS CON PLOMO SANGUINEO 25 mcg/100 ml.	
	PARA AFIRMARLO*	PARA DESCARTARLO**	PARA AFIRMARLO+	PARA DESCARTARLO++
200 U.	0.7500	0.1000	0.4000	0.4800
300 U.	0.8285	0.1142	0.4857	0.5142

CUADRO No. 4

- *: La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona tenga plomo ≥ 15 - al encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300
- ** : La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona no tenga plomo ≥ 15 - al no encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300
- +: La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona tenga plomo ≥ 25 - al encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300
- ++ : La cifra indicada es la probabilidad de acierto - de que la persona no tenga plomo ≥ 25 - al no encontrar que tiene DALA por abajo de 200 ó 300

Por otra parte si el paciente que no modifica plomo no tiene en su sangre una actividad de DALA ≤ 200 U. se encontró que existe una probabilidad de 0.1000 de que no tenga una concentración ≥ 15 mcg/100 ml.; y si el paciente no tiene una actividad de DALA ≤ 300 U. tiene una probabilidad de sólo 0.1143 de que no tenga plomo sanguíneo ≥ 15 mcg/100 ml.

Por lo que respecta a la identificación de enfermos -- que no modifican plomo con una concentración de plomo sanguíneo ≥ 25 mcg/100 ml.; se observó que existe una probabilidad de 0.4000 de que el paciente tenga ese nivel de concentración de plomo si se le observa una actividad de DALA ≤ 200 U.; si ésta última es ≤ 300 U. la probabilidad de que tenga el nivel de plomo mencionado disminuye a 0.4857, pero si el paciente no tiene una actividad de DALA ≤ 200 U. existe una probabilidad de 0.4800 de que no tenga plomo sanguíneo ≥ 25 mcg/100 ml.; una probabilidad semejante a 0.5143 existe de que no tenga estos niveles de plomo si no se observa una actividad de DALA ≤ 300 U.

*Los valores de DALA y plomo obtenidos en el estudio - se encuentran en el Anexo II

CONCLUSIONES

Con el actual desarrollo tecnológico, la actividad del Q.F.B. se ha ampliado, no sólo por el número de campos de acción, sino también por la aparición de modalidades de trabajo conjunto con profesionales y especialistas de otras áreas del conocimiento. Esto se da con mayor frecuencia en los grupos de investigación que -- tienen como responsabilidad social el estudio de procesos multifactoriales o la aplicación de acciones relacionadas con este tipo de procesos. Para que el Q.F.B. participe con éxito en este tipo de grupos de trabajo se requiere por una parte que durante su formación se le capacite en el trabajo de diferentes tipos de procedimientos y en la comprensión de los principios generales que los rigen, y, por otra parte, que tenga la capacidad para comprender en forma general el problema - en estudio desde diferentes puntos de vista, de tal manera que pueda delimitar con éxito las funciones que - tienen los distintos enfoques, de modo que pueda delimitar las responsabilidades correspondientes a cada elemento del grupo de trabajo y asuma las que le corresponden. En estas acciones están implícitas las responsabilidades: a) De recabar las posibles técnicas

con las que pueda observarse, directa o indirectamente un proceso; b) De analizar cada una de ellas desde -- los puntos de vista químico, económico, de factibili-- dad y conveniencia de acuerdo a los propósitos especí-- ficos del proyecto; c) De montar la técnica y valo-- rar su pertinencia para alcanzar los propósitos del -- proyecto, o en su caso desarrollar métodos idóneos; - d) De identificar los principales factores de error y variación; e) Derivar las soluciones prácticas para - estos factores; f) Instrumentar los sistemas de con-- trol de calidad; g) Efectuar los análisis correspon-- dientes al proceso químico.

En el proyecto presentado se requirió la aplicación de métodos analíticos de espectrofotometría de absorción atómica para la cuantificación de plomo y de espectro-- fotometría visible para la observación indirecta de la actividad enzimática como una técnica de uso más gene-- ralizable para la detección de personas con concentra-- ciones de plomo relativamente elevadas. Para alcanzar este último propósito se requiere la clara comprensión de las diferencias precisas que existen entre los usos bioquímicos y epidemiológicos de un procedimiento; ya que para el primero de ellos se requieren sistemas de observación más complicados y específicos ---- y por -

esto más costosos ----, para el estudio epidemiológico fundamentalmente se necesitan métodos de bajo costo, - posibles de llevarse a cabo con equipos sencillos disponibles en la mayoría de las regiones de nuestro país. Sin embargo, los métodos más sencillos por lo general son poco específicos y por esta razón tienen error tanto al indicar la existencia de un estado como al señalar que no existe esta condición. La magnitud de estos errores depende directamente de la frecuencia con la que existe en una comunidad dada el estado que se pretenda observar. Es lógico esperar que el método indirecto nunca se equivoque, al señalar la existencia de una condición, si esta condición se da en todos los miembros de la comunidad, igualmente nunca se equivocará al señalar que no existe si ésta circunstancia no se encuentra en una comunidad.

Pero es obvio que si ya se conociera que todos o ninguno de los miembros de la comunidad tienen la condición en estudio, carecería de sentido proponer el empleo de un método de estudio; esto no ocurre en las condiciones en que se presentan los problemas de salud; en la realidad, la mayoría de los procesos epidemiológicos se dan sólo en algunos subgrupos de la población y en ellos sólo en una proporción desconocida de individuos

por esta razón, para la observación de la mayoría de los factores y procesos, es necesario el desarrollo de métodos indirectos, los cuales en mayor o menor grado tienen errores al indicar la presencia o ausencia de una condición, por lo que antes de emplearlos en estudios epidemiológicos, es necesario conocer la magnitud del error y de ser posible, las condiciones en las que es mayor o más frecuente.

Como se señaló en la introducción, se requiere un método, factible, accesible y de bajo costo para identificar a aquellas personas con concentraciones de plomo relativamente más elevadas. Esto es más importante hacerlo en mujeres embarazadas ya que existe la probabilidad de que el plomo elevado pueda afectar el desarrollo y/o la función del sistema nervioso central de sus hijos. Los resultados obtenidos con las mediciones de la actividad de DALA permiten afirmar que este método puede ser útil en estudios de detección ya que si en estas pacientes se observa una actividad de DALA \leq a 200 U. existe una probabilidad de casi el 73% de que esa paciente tenga una concentración sanguínea de plomo \geq 15 mcg/100 ml.; es decir, existe un error del 27% cada vez que se emplee el método. Por otra parte, si la paciente no tiene una actividad de DALA \geq a 200 U. existe

una probabilidad del 88% de que la paciente no tenga - plomo sanguíneo \geq 25 mcg/100 ml., es decir, existe un 12% de error al emplear el método.

Si se pretendiera aplicar este método como un sistema de rutina en el sistema asistencial, sería conveniente efectuar otros estudios con objeto de identificar, ya sea las características de las pacientes o de los factores que en ellas se presentan que están relacionados con los errores en la identificación de la presencia o de la ausencia de concentraciones de plomo relativamente elevadas.

Respecto a esta circunstancia, existen indicios de la existencia de interacciones entre el plomo y otros compuestos, tales como el Zinc, Cobre, Hierro, Cadmio, -- así como la existencia de grupos de personas con diferente actividad de DALA determinadas de origen genético, puedan ser la fuente de error. Por esta razón es posible que la existencia de estas interacciones pudie ran explicar la observación de embarazadas con plomo y sin alteraciones en la actividad de DALA. Si el bloqueo del efecto biológico del plomo se dá, no sólo respecto a la actividad de DALA, sino también sobre el -- efecto nocivo sobre el desarrollo de la función nerviosa del niño, carecería de importancia el error en las

exactitudes indicativas positivas. Esta es un área - de investigación importante, tanto desde el punto de - vista cognoscitivo, como del pragmático, puesto que -- estos agentes podrían emplearse en la prevención de -- los efectos nocivos.

Por otra parte, si se considera que en ausencia de em- barazo las personas sanas tienen valores mucho más ba- jos en las exactitudes predictivas, ----Positivas o ne- gativas para indicar la existencia de plomo ≥ 15 mcg/ 100 ml.---- que los observados en las embarazadas, es- to sugeriría la existencia de un mayor número de facto- res que afectan la utilidad de DALA en este grupo de - personas o que el resultado final de los ajustes fisio- lógicos que se observan en la embarazada, permiten que se exprese una mayor relación entre plomo y actividad de DALA.

Entre los pacientes con enfermedades que modifican las concentraciones de plomo no se observaron resultados - que indicaran la existencia de factores que afecten la capacidad indicativa positiva de la actividad de DALA para señalar la existencia de plomo sanguíneo ≥ 15 -- mcg/100 ml., ya que tanto con los niveles de 200 y 300 U. de DALA se obtuvo una exactitud indicativa positiva

de 1 que es el máximo posible; como sucede con frecuencia, en este caso también se observó que ante valores elevados de exactitud predictiva positiva se obtuvieron valores bajos de exactitud predictiva negativa.

En enfermos con padecimientos que no modifican plomo se obtuvieron valores útiles de exactitudes predictivas positivas para señalar la existencia de concentraciones de plomo ≥ 15 mcg/100 ml.; sin embargo, para indicar la existencia de concentraciones de plomo ≥ 25 mcg/100 ml. y, la ausencia tanto de plomo ≥ 15 mcg/100 ml., como de plomo ≥ 25 mcg/100 ml., no se obtuvieron valores útiles en las exactitudes predictivas indicativas por lo que es posible suponer la existencia de factores que afectan la capacidad indicativa de DALA en este grupo de pacientes.

Del proyecto descrito, se desprende que ---independientemente de la identificación de los límites en la actividad de DALA con los que es posible detectar indirectamente la existencia de concentraciones elevadas de plomo en las mujeres embarazadas--- es conveniente la continua participación de los Q.F.B. como miembros de grupos interdisciplinarios que aborden a este nivel los problemas de salud pública que afectan a nuestras comunidades. Por ello, es pertinente propiciar la --

interacción académica entre los grupos de investigación de esta área y las instituciones educativas responsables de la formación de Químicos profesionales.

ANEXO I

Determinación de plomo en sangre; modificación al método de Bessman y Layne por RICE E.W.

Es necesario que todo el material de vidrio sea lavado con detergente y agua, remojado toda la noche en ácido nítrico (1 + 1) seguido por un enjuague con agua caliente, y finalmente con suficiente agua destilada -- deionizada y finalmente cuidado de contaminaciones.

Para todos los reactivos se usará agua recién destilada deionizada o agua redestilada.

Los Reactivos serán de grado reactivo a excepción de los siguientes:

Acido sulfúrico 95% destilado doble al vacío

H NO₃ concentrado redestilado

Acido perclórico 70% W/V destilado doble al vacío

Hidróxico de amonio, libre de fierro, densidad 0.92

Ditizona

Cloroformo redestilado libre de fierro y cobre

- 1.- Reactivo de digestión.- Cuidadosamente mezclar 25 volúmenes de ácido nítrico concentrado y 10 volúmenes de ácido sulfúrico concentrado. Preparar fresco el reactivo para cada determinación.
- 2.- Acido perclórico 70% (W/V), guardar en refrigeración.
- 3.- Hidróxido de amonio concentrado.
- 4.- Rojo de fenol 0.10% (W/V).
- 5.- Solución de Ditizona. Disolver 30.0 mg. de difeniltio carbazona (ditizona) en exactamente 1 L. de cloroformo redestilado. Guardar esta solución en un frasco café en un refrigerador, pero dejarlo a temperatura ambiente antes de usarlo.
- 6.- Solución buffer. Disolver 118 g. de citrato de amonio dibásico $(\text{NH}_4)_2 \text{HC}_6 \text{H}_5 \text{O}_7$, en agua, añadir 75 ml. de hidróxido de amonio concentrado, y diluir a 250 ml. con agua. Cuando la solución se ha enfriado a temperatura ambiente añadir 5.0 g. de cianuro de potasio y 2.5 g. de sulfito de sodio anhidro, Na_2SO_3 . Extraer la solución buffer con ditizona hasta que la capa de cloroformo permanezca verde. Añadir 500 ml. de hidróxido de amonio concentrado.

Esta solución es estable a temperatura ambiente.

Efectuar este procedimiento en una botella de vidrio con tapón, marcada en la parte - de afuera con líneas correspondientes a el volumen a el cual la solución es diluida. Acompañar la extracción por adición aproximadamente de alícuotas de 2 ml. de ditizona y agitar. Separar la capa clorofórmica de la acuosa.

- 7.- Reactivo de lavado. Disolver 5 g. de cianuro de potasio en 250 ml. de hidróxido de amonio concentrado y diluir a 500 ml. con agua.
- 8.- Stock standard, 1.05 mg. Pb/ml. Disolver 0.183g. de acetato de plomo trihidratado, $Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3H_2O$ en agua conteniendo 1 ml. de ácido acético glacial y diluir a 100 ml. con agua.
- 9.- Standars de trabajo 4.0 y 8.0 mcg. pb/ml. prepararlos recientemente por dilución del stock 1:50 con agua. Use alícuotas de 2.00 y 4.00 ml. (correspondientes a 4.0 y 8.0 mcg Pb/ml).

Procedimiento:

- 1.- Pipetear dentro de un tubo de vidrio de borosilicato con tapón de 25 x 200 mm. 2.00 m. de

sangre heparinizada.

- 2.- En cada etapa incluir tubos para blanco y dos -- standards conteniendo respectivamente 10.0 ml. de agua y 2.00 y 4.00 ml. de solución standard de -- trabajo.
- 3.- A todos los tubos añadir 5.0 ml. de reactivo de - digestión y 3 perlas de vidrio.
- 4.- Colocar en una micro parrilla cada tubo hasta que aparezca humo blanco. Remover los tubos y dejarlos que se enfríen a temperatura ambiente. En es ta etapa, la sangre es café oscuro y el blanco - y standard son esencialmente menos coloridos. -- Añadir 0.6 ml. de ácido perclórico a cada tubo -- frío y cubrirlos.

NOTA: Checker (I.S.) recomienda añadir 1-2 ml. - de una mezcla de HNO_3 y HClO_4 1+1.

- 5.- Recalentar cada tubo y continuar el calentamiento hasta que la solución pase de amarillo; menos colorido; amarillo con espuma; finalmente menos colorido y claro. Puede permanecer muy ligeramente amarillo en este punto la digestión es completa dejar enfriar a temperatura ambiente.

NOTA: La digestión café oscuro de la sangre pasa

lentamente a amarillo y en 40 - 60 minutos son --
menos coloridos. Checker (I.S.) añade 5.0 ml. de
agua a el residuo frío y repite la digestión. --
Esto asegura la eliminación de todos los óxidos -
volátiles.

6.- Añadir 5 ml. de agua a cada tubo, seguido por la
adición gota a gota de 4 ml. de hidróxido de amo-
nio concentrado mezclando. Dejar que la mezcla
se enfrié y añadir 1 gota de rojo de fenol Si la
solución ha sido neutralizada suficientemente, --
permanecerá roja. Si la alcalinización ha sido -
pobre, añadir hidróxido de amonio gota a gota -
hasta que la solución sea roja.

7.- Añadir 10.00 ml. de solución buffer a cada tubo -
seguido en un minuto por 3.00 ml. de solución de
ditizona.

8.- Tapar todos los tubos con un tapón de vidrio y --
agitar vigorosamente 20 veces.

9.- Usando una pipeta capilar y un aspirador de agua
separar el supernadante acuoso.

NOTA: Si la capa de ditizona es coloreada rojiza,
añadir 3.00 ml. más de solución de ditizona, y --
agitar la mezcla otra vez. Continuar con el --

resto de el procedimiento. Para obtener el valor correcto para plomo en el espécimen doblar la -- absorbancia

NOTA: Checker (R.B.F.) recomienda la adición ini cial de 5.00 ml. de ditizona como más apropiado - que 3.00 ml.

10.- Añadir 10.0 ml. de reactivo lavador, reagitar -- hasta aclarar, y remover la capa supernadante por aspiración.

11.- Humeder un filtro de papel whatman No. 547 de -- 7 cm. con cloroformo y filtrar la solución final de cloroformo en una celda y tapar rápidamente.

NOTA: Checker (I.S.) recomienda centrifugar por 3 minutos a alta velocidad.

12.- Determinar la absorbancia de el blanco, standard, y las muestras a 510 m μ contra un blanco de cloroformo. Aunque el color es estable por 24 horas, obtener todas las lecturas rápidamente, con el fin de minimizar los efectos de evaporación.

cálculos:

$$\text{mcg Pb/100 ml} = \frac{A(\text{muestra}) - A \text{ blanco}}{(A_{4\text{mcg std}} - A \text{ blanco}) + (A_{8\text{mcg std}} - A \text{ blanco})} \times 12 \times \frac{100}{2}$$

ANEXO II

Valores de plomo y dala obtenidos en el estudio :

Grupo "A" o de "PERSONAS SANAS SIN EMBARAZO".

CLAVE	PLOMO mcg/ 100 ml	DALA U.	CLAVE	PLOMO mcg/ 100ml	DALA U.	CLAVE	PLOMO mcg/ 100ml	DALA U.
660032	21	213	660014	18	265	66003	15	233
908801	23	252	99006	17	624	99023	15	655
902302	24	357	660001	18	369	660018	18	365
660006	02	432	660014	18	530	660024	20	351
66001	17	770	66002	21	625	66003	15	405
88035	15	526	88046	18	485	9030016	19	336
9030027	18	314	9030026	18	314	9030017	19	336
9023026	24	357	900803	18	441	9102017	15	111
9099027	18	196	9099028	17	196	9098027	22	145
9095027	16	156	9093027	15	166	9095028	16	156
9092027	20	171	9088027	17	168	9088028	17	168
901801	19	174	9014016	19	072	9008016	21	128
9006016	22	084	9006017	21	186	900426	17	127
90040262	17	127	660006	09	312	660005	13	329
660004	13	360	660026	11	303	660016	13	344
9018047	10	355	9074017	10	409	9078017	10	409
99003	14	443	66002	12	590	66003	08	530
66004	0	375	88038	12	388	99024	13	618
660007	02	246	907603	10	242	88004	6	218
88044	06	200	88050	07	153	900101	0	120
88050	07	153	900101	0	120	900101b	0	120
9002016	12	186	900602	04	58	9006021	04	58
9074027	0	140	907602	07	142	9076027	07	142
9097017	11	172	9097027	13	176	9097018	11	172
9097028	13	176	9098021	12	145	910101	14	168
9101017	14	168	9103017	12	122	9103018	12	122
9095017	12	150	9095017	12	150	660010	25	313
88045	30	395	88047	38	360	99025	35	348
99026	40	332	660021	41	74	660029	38	163
66004	27	175	66006	29	139	900403	29	174
90050016	28	111	900502	25	25	900501	28	111
9005026	25	25	9020026	45	154	9091027	26	176
9091028	26	176	660019	28	229	660014	25	208
660005	45	211	660011	42	255	88031	33	234
9091017	26	272	9091018	26	272	9092017	33	209
66003	10	177	66005	8	173	660009	17	235
660015	18	250	660021	21	239			

Grupo "B" o de "PERSONAS CON ENFERMEDADES QUE NO MODIFICAN PLOMO"

CLAVE	PLOMO mcg/ 100 ml	U. DALA	CLAVE	PLOMO mcg/ 100 ml	U. DALA
665101	18	126	661207	16	234
66581	21	284	66158	15	297
66191	15	274	66192	19	206
66161	14	200	661203	14	195
661215	11	113	665120	9	155
665104	8	154	66127	13	139
66522	25	076	66187	39	119
66590	38	153	66544	46	197
661125	28	081	665121	38	123
661245	25	114	66553	28	169
661126	47	204	66554	40	267
661189	30	265	661219	25	222
66517	26	233	66589	32	257
665124	44	239	665108	42	218
661149	33	424	66512	31	358
66147	34	356	66567	25	353
661106	30	472	661104	39	771
66107	35	587	661239	32	599
661110	27	427	66552	41	547
661220	33	405	66579	33	673
66558	38	364	66564	38	762
66560	34	630	661164	31	483
661139	30	444	66094	23	285
660205	23	268	66575	23	285
66145	14	267	66593	12	231
66160	14	263	66526	19	354
66565	16	339	66566	18	435
66502	19	328	66532	19	508
66531	18	433	DM(1828)	15	535
66505	15	358	66535	21	429
66516	22	522	66503	24	625
66501	24	599	66171	23	429
66578	24	561	66533	23	490
66118	23	626	66538	23	457
661119	22	336			

Grupo "C" o de "EMBARAZADAS SANAS"

CLAVE	PLOMO mcg/ 100ml	U.DALA	CLAVE	PLOMO mcg/ 100ml	U.DALA
660116	46	76	660591	26	120
660102	28	138	66199	57	269
66170	26	518	66142	43	313
66103	47	722	66111	34	804
66523	29	416	66021	19	190
66021	19	190	66596	19	157
66163	12	177	66184	03	164
66069	05	134	66167	19	189
661101	17	178	66190	17	136
66180	0	241	661127	12	290
66595	11	289	66157	11	266
66172	0	217	66189	10	256
66150	11	275	66188	0	224
661111	02	207	661115	24	260
66186	24	335	66506	13	301
66181	14	507	66162	04	336
66162	04	366	66156	10	320
66175	0	507	66124	10	428
66124	10	428	66164	14	440
66151	05	452	661118	14	465
66159	10	372	661113	14	302
66130	10	455	66154	22	491
66198	21	333	66577	15	831
66185	21	322	66569	19	378
66125	15	364	66110	15	323
66176	18	313	66174	16	560
66563	21	675	65584	23	553
66112	20	661	66534	16	544
66117	17	554	66141	21	349
66148	16	393	66196	20	353
66168	15	346	66585	15	398
661107	15	480			

Grupo "D" o de "PERSONAS CON ENFERMEDADES QUE INCREMENTAN LAS CONCENTRACIONES DE PLOMO"

CLAVE	PLOMO mcg/ 100ml	U.DALA	CLAVE	PLOMO mcg/ 100ml	U.DALA
665122	21	275	661200	20	31
661185	22	345	66582	20	390
66177	24	480	66555	15	412
661121	18	411	66182	18	358
661122	18	357	66115	18	474
661206	11	408	665129	38	126
661182	58	18	665117	43	189
66513	41	153	66518	47	194
66572	32	176	66195	34	194
661198	38	65	661108	32	21
66155	27	140	66587	37	339
661201	31	364	661103	52	483
66104	46	551	66153	34	300
661109	28	570	665113	25	585

BIBLIOGRAFIA

- 1.- BATTISTINI V.J.J., et. al. (1971) Erythrocyte delta-amino laevulic acid dehydrase activity in anaemia. *J Haematol* 20: 117-184
- 2.- BENSON P.F., CHISOLM D. (1960) A reliable qualitative urine coproporphyrin test for lead intoxication in young children. *J Pediatrics* 56: 6-759-767
- 3.- BLANKSMA L.A. (1970) Failure of the urinary delta-amino-levuline acid test to detect pediatric lead poisoning. *Am J Clin Pathology* 56: 6-956-962
- 4.- BOTTA A., et. al. (1986) Chromobiological study of ALA in man. *Rev Med Interne* 7: 4-421-424
- 5.- BONSIGNORE D., CALISSANO P., CARTASEGNA C., (1965) - Un semplice metodo per la determinazione della d-amino-levulinico-deidratasi nel sangue. *Med Lavoro* 56: 199-205
- 6.- BONSIGNORE D. (1966) L'attivita'ala-deidratasica eritrocitaria quale test diagnostico nel saturnismo professionale. *Med Lavoro* 57: 647-654
- 7.- BORTOLI A., et. al. (1986) Relation between concentration of lead blood and DALA in worker alcoholic. -- *Arch Environ Health* 41: 251-260
- 8.- BROWDER A.A. (1973) The problem of lead poisoning. *Medicine* 52: 121-139
- 9.- BURCH H.B., and SIEGEL A.L. (1971) Improved method -- for measurement of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity of human erythrocytes. *Clin Chem* 17: 1038-1041
- 10.- BURNHAM B.F., and LASSELLES (1963) Control of porphyrin biosynthesis through a negative feed back mechanism. Studies with preparations of d-aminolevulinic acid synthetase and d-aminolevulinic acid dehydrase from *Rhodospseudomonas Spheroides*. *Biochem J* 87: 462-470

- 11.- BURNHAM B.F. (1969) Metabolism of porphyrins and corrinoids. In: "Metabolic Pathways". Greenberg D.M. - Ed 3th Edition Vol III, Chapt 18, pp. 404-537 Academic Press
- 12.- COLEMAN D.L. (1970) D-amino levulinate dehydratase. - In: "Methods in Enzymology" Herbert Rabor XVII A: 195-200 Academic Press
- 13.- DAVIS J.M., et al (1987) Lead and Child Development. Nature 329 (6137): 297-300
- 14.- DAVIS J.R., Abrahams H.R., Fishbein I.W., Fabrega E.A. (1968) urinary delta-aminolevulinic acid (ALA) levels in lead poisoning. Arch Environ Health 17: 164-170
- 15.- DAVIS J.R. (1970) Reliability of urinary delta-aminolevulinic acid as a mass screening technic for childhood exposure to lead. Am J Clin Path 56: 967-969
- 16.- DAWSON E.B. (1974) Analysis of serum-determination of copper and zinc. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. Perkin Elmer 403 pp. Bc-5. -- The Perkin-Elmer Corp. Norwalk Conn. U.S.A.
- 17.- DIENER W., et al (1987) Statistical investigations in to the measured DALA discharge in the urine of infants. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 31 (2): 153-161
- 18.- DRESEL E.L.B. and Falk (1956) Studies on the biosynthesis of blood pigments 2. Haem and porphyrin formation in intact chicken erythrocytes. J Biochem 63: 72-79
- 19.- ERNHAST C.B., et al (1987) Low level exposure in the prenatal and early preschool periods; early preschool development. Neurotoxicol Terat 9: 3-259-270
- 20.- FEINSTEIN A.R. (1975) On the sensitivity, specificity and discrimination of diagnostic test. Clin pharmacol Ther 17: 104-116
- 21.- GIBSON K.D., Neuberger A. and Scott J.J. (1955) The purification and properties of d-aminolaevulinic acid dehydrase. Biochem J. 61: 618-639
- 22.- GOLBERG A., Ashenbrucker H., Cartwigh F.E., Wintrobe H. (1956) Studies on the biosynthesis of heme in vitro by avian erythrocyte. Blood 11: 821-833

- 23.- GRABECKI J., Haduck T., Urbanswicz H. et al (1967) - Die einfachen bestimmungsmethoden der delta aminolavulinsäure im harn. Int Arch Gewerbepath 23: 226-240
- 24.- GRANICK S. and Mauzerall D. (1958) Porphyrin biosynthesis in erythrocytes 11. Enzymes converting d-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen. J Biol Chem 232: 1119-1140
- 25.- GRINSTEIN M., Bannerman M. and Moore C. (1959) The utilization of protoporphyrin 9 in heme synthesis. Blood 14: 476-485
- 26.- HAEGER-ARONSEN B., Abdulla M., Msc; Fristedt B., MD (1971) Effect of lead on d-aminolevulinic acid dehydratase activity in red blood cells. Arch Environ Health 23: 440-445
- 27.- HAEGER-ARONSEN B., Abdulla M., and FRISTEDT B.L. (1974) Effect of lead on d-aminolevulinic acid dehydratase activity in red blood cells. II Regeneration of enzyme after cessation of lead exposure. -- Arch Environ Health 29: 150-153
- 28.- HEILMEYER L. (1963) Porphyria erythropoetica congenita Guntner Bericht über zwei familien mit erfassung der markmalsträger. Deut Med Wochschr 88: 2449-2456
- 29.- HERNBERG S., Tola S., Nikanen J., Valkonen S. (1972) Erythrocyte d-aminolevulinic acid dehydratase in -- new lead exposure. Arch Environ Health 25: 109-113
- 30.- HERNBERG S., Nikanen J., Mellin G., and Lilius H. -- (1970) D-aminolevulinic acid dehydrase as a measure of lead exposure. Arch Environ Health 21: 140-145
- 31.- HESSEL B. W. (1974) Analysis of blood-determination of lead using an extraction procedure. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry Perkin-Elmer 403, pp Bc 11. The Perkin-Elmer Corp Norwalk, Conn U.S.A.
- 32.- KAMMHOLOZ P., Thatcher L., Blodgett F. and Good T. -- (1972) Rapid protoporphyrin quantification for detection of lead poisoning. Pediatrics 50: 625-631
- 33.- KATSUMARO T. (1974) New method for determination of ALA activity of human erythrocytes as an index of lead exposure. Clin Chem 20: 1287-1291

- 34.- KATSUMARO T. (1972) Simple method for determination of urinary d-aminolevulinic acid as an index of lead exposure. Clin Chem 18: 1534-1536
- 35.- KREIMER B. (1965) Porphyrin biosynthesis III porphyrin metabolism in experimental lead poisoning. - Biochem Biophys Acta III: 110-123
- 36.- LICHTMAN H.C. and Feldman F. (1963) In vitro pyrole and porphyrin synthesis in lead poisoning and iron deficiency. J Clin Invest 42: 830-839
- 37.- MAGNUS I.A. (1961) Erythropoietic protoporphyria a new porphyria syndrome with solar urticaria due to protoporphyriaemia. Lancet 2: 448-451
- 38.- MAUZERALL D. and Granicks S. (1956) The occurrence and determination of d-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urin. J Biol Chem 219: 435-446
- 39.- MILLAR J., Cumming R., Battistini V., Canswell F. - and Goldberg A. (1970) Lead and d-aminolaevulinic acid dehydratase levels in mentally retarded children and in lead poisoned sucking rats. Lancet 2: - 695-698
- 40.- MORALES R.J., Gutierrez R.G., Corro S.A. (1987) Estudio longitudinal de las necesidades de atención poblacional, I Variaciones en las tasas generales. Rev Med Dist Fed México 4: 175-178
- 41.- MORROW J.J., Urata G. and Goldberg A. (1969) The effect of lead and ferrous and ferric iron on d-aminolaevulinic acid synthetase. Clin Sci 37: 533-538
- 42.- MUORE M.R., Beattie A., Thompson G. and Goldberg A. (1971) Depression of d-aminolaevulinic acid dehydratase activity by ethanol in man and rat. Clin Sci 40: 81-88
- 43.- NAKAU K., Wada O., Yano Y. (1968) D-aminolaevulinic acid dehydratase activity in erythrocyte for the evaluation of lead poisoning. Clin Chem Acta 19: 319-325
- 44.- NANDI D.L., Bake-Cohen K.F., Shemin D. (1968) ---- D-aminolaevulinic acid dehydratase of Rhodopseudomonas Spheroides I. Isolation and properties. J Biol Chem 243: 1224-1230

- 45.- NANDI D.L. and Shemin D. (1968] D-aminolaevulinic acid dehydratase of Rhodopseudomonas Spheroides. II Association to polymers and dissociation to subunits. J Biol Chem 243: 1231-1235
- 46.- PETERKA E. S. (1965] Erythropoietic protoporphyria. JAMA 193: 1036-1042
- 47.- PREROVSKAI, Teisinger J. (1970] Excretion of lead - and its biological activity several years after termination of exposure. Br J Ind Med 27: 352-355
- 48.- SAITA G., Moreo L. and Groce G. (1966] Porphyrin Metabolism in chronic saturnism and in non saturnism anaemia and liver disease. Med Lavoro 57: 167-174
- 49.- SANCHEZ C.J. (1976] Estudio de la confiabilidad de la excreción urinaria del ácido Delta-aminolevulinico para la identificación de los efectos biológicos del plomo contaminante ambiental. Influencia del ciclo circadiano. Tesis Profesional Facultad de Química UNAM
- 50.- SCHWARTZ S., Zieve L. and Watson C. (1951] An improved method for the determination of urinary coproporphyrin and an evaluation of factors influencing the analysis. J Lab Clin Med 37: 843-859
- 51.- SCHWARTZ J., et al (1987] blood lead, hearing --- thresholds, and neurobehavioral development in children and youth. Arch Environ Health 42: 3 153-60
- 52.- SHARP D.S., Becker C.E., Smith A. (1987] Exposure - chronic to low level to lead related pathogenesis hypertension. Med Toxicol 2: 210-232
- 53.- SHARP D.J.O. and Becker (1989] Elevated Blood Pressure in Treated hipertensives with low level lead accumulation. Environ Health 44-1
- 54.- SHARE I. (1974] Analysis of blood determination of mercury. Analytical methods for atomic absorption - spectrophotometry. Perkin-Elmer 403 pp Bc-23. The Perkin Elmer Corp Norwalk Conn U.S.A.
- 55.- SHEMIN D. (1970] D-aminolevulinic acid dehydratase. In "Methods in Enzymology" Herbert Tabor XVII A: 205-210 Academic Press

- 56.- TOMOKUNI K., et. al. (1987) HPLC Optimized method by fluorometry urinary Dala in worked exposed to -- lead. Clin Chem 33 (9): 1665-1667
- 57.- ULMER D.D. (1969) Trace substances in environmental health. II Proc Univ Missouri Ann Conf. Trace substances environ Health 2nd ed DD Hemphill Columbia Univ Missouri. Citado por Vallee B. L. Op. Cit.
- 58.- VALLEE B.L. and Ulmer D. (1972) Biochemical effects of mercury cadmium and lead. Annu Rev Biochem 41: 91-128
- 59.- VARADI S. (1958) Haematological aspects in a case of erythropoietic porphyria. Brit J Hematol 4: -- 270-280
- 60.- WEISSBERG J.B., B.A., Lipschutz F. and Oski F. A. - (1971) D-adminolevulinic acid dehydratase activity in circulating blood cells. A sensitive laboratory test for the detection of childhood lead poisoning. New Engl J. Med 284: 565-569
- 61.- YAMANE T., (1967) STATISTICS 2nd. Ed. New York -- Harper INTERNATIONAL pp 613-641
- 62.- ZUGASTI B.M.R., (1989) Efectos del plomo contaminante en el desarrollo fisiconeurológico. Tesis de la Maestría en Salud Pública. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa
- 63.- RICE E.W., FLETCHER D.C., (1963) Lead in blood -- and urine. In: Meites S(ed) Standard Methods of - Clinical Chemistry Vol 5 New York Academic Press -- 121-129