

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Exactas



“Alteraciones bioquímicas, hematológicas y de distribución y acumulación de plomo en un modelo animal y en humanos”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de La Plata en el área de Ciencias Biológicas

Fernando Daniel Ventimiglia

Director: Dra. Nilda Esther Fink

Co-director: Dr. Alfredo Salibián

Lugar de trabajo: Cátedra de Hematología, Área Bioquímica Clínica
Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

La Plata, 2013

“...un hombre puede ser vencido, pero no derrotado...”

E. Hemingway- El viejo y el mar

Premio Nobel de Literatura, 1954

Agradecimientos

Quiero en primer lugar, agradecer a mi directora, la Dra. Nilda Fink por su eterna paciencia (sin dudas, el sabio es indulgente con el joven), por haberme estimulado a realizar este trabajo de tesis y de haberme abierto las puertas de su laboratorio y de su corazón.

A mi co-director, Dr. Alfredo Salibián, por su opinión experta y su guía en esta materia.

A Grisel Tenaglia, Pamela De Francesco, Susana Feregotto y a la inolvidable Lic. Martínez de la Biblioteca de FABA, por su inestimable ayuda y dedicación para la búsqueda de los trabajos científicos que forman parte de la bibliografía de este trabajo.

Al Bioq. Marcos Arrieta, la Dra. Carolina Rosemberg, la Dra. María Elena Chiesa, la Dra. Carina Apartín, la Dra. Liliana Bruzzone, la Bioq. Laura Mauleón y el Dr. Nelson Albiano, por su inestimable contribución y colaboración en la realización de este trabajo.

A mi familia por su apoyo, aunque no alcanzaran a dimensionar el esfuerzo, mis disculpas por tantas ausencias, por las cosas que debimos resignar, gracias por iluminarme el camino, por envolver en azúcar los momentos difíciles, por empujarme cuando lo necesité, por despedirme con un beso aún cuando les privé de un padre y esposo.

A mis queridos padres y hermano, por todo el amor que me dieron y continúan brindando a la distancia, por su apoyo incondicional, por que sus valores me marcan el norte, y porque la persona que soy es gracias a ellos.

A mis compañeros de la Cátedra de Hematología de la Fac. de Ciencias Exactas de la UNLP, por su colaboración, por ponerme el hombro, por sus consejos y estímulo.

A mis jefes y compañeros del Laboratorio D'Agostino-Bruno, por comprendido la importancia de este trabajo para mi formación, por haberse interesado en mi investigación, por su apoyo.

Resumen

El Plomo es un metal que la humanidad ha utilizado desde la antigüedad para diversos fines, pero que conlleva un problema eco-toxicológico de gran importancia, siendo el principal tóxico metálico de la actualidad y de mayor importancia en la producción de enfermedad laboral por metales.

El objetivo de esta tesis, fue evaluar el impacto del plomo sobre parámetros bioquímicos, hematológicos, diversos órganos blanco de los sistemas biológicos y esbozar un modelo animal de distribución del metal en el organismo, de manera tal que sea de utilidad para estudios eco-toxicológicos.

En estudios con animales (*Rhinella arenarum*), se observó que existe una mayor acumulación del metal en órganos blandos (hígado, bazo y riñón), debido a la mayor velocidad captación del metal por éstos respecto al tejido óseo, en una experiencia que se realizó durante 42 días transcurridos luego de la inyección de una dosis semanal de acetato de plomo. El metabolismo óseo resultó más lento ya que cobra mayor importancia en el mecanismo de detoxificación a largo plazo. El órgano blando que presentó la mayor acumulación de plomo, fue el hígado. Asimismo, se estudió el efecto del plomo sobre diferentes parámetros bioquímicos. Se halló que el parámetro más sensible en sangre periférica, fue la actividad de la ALAD, que es un indicador de efecto, mientras que la concentración de protoporfirinas no fue suficientemente sensible. En relación a estos parámetros bioquímicos, en humanos existieron coincidencias con estos resultados.

También en humanos, se estudió el efecto del plomo sobre el metabolismo del hierro, encontrándose que existe un aumento en la concentración sanguínea de este último en la intoxicación plúmbica. Estos resultados, están de acuerdo a datos bibliográficos referidos a la menor utilización biológica debido a la inhibición enzimática que produce el primero en la vía de síntesis del grupo Hemo. En función de estos datos, es posible postular a la ferremia, como un marcador de efecto en la intoxicación con plomo, pudiendo utilizarse en el monitoreo de la población expuesta laboralmente, ya que resulta accesible a los laboratorios de análisis clínicos generales, por el costo y el instrumental necesario, y constituye un análisis complementario a la medida de la plumbemia, siendo más sensible que los datos aportados por el estudio hematológico.

Palabras claves: plomo, modelo de distribución, acumulación de plomo, metabolismo del hierro.

Summary

Lead is a metal that mankind has used since ancient times for various purposes, but which involves eco-toxicological risks of great importance. It is the main toxic metal today and the most important in the production of occupational disease by metals.

The aim of this thesis was to evaluate the impact of lead on biochemical, hematological, various target organs of biological systems and outline an animal model for metal distribution in the body, so it could be useful for eco-toxicological studies.

In animal studies (*Rhinella arenarum*) we observed that there is a greater accumulation of the metal soft organs (liver, spleen and kidneys) due to the increased speed of metal uptake by these organs in relation to the bone tissues, done in an experience conducted for 42 days after injection of a weekly dose of lead acetate. Bone metabolism is slower and is of more importance in the long term detoxification mechanisms. The soft body that had the highest lead accumulation was the liver. Additionally, we studied the effect of lead on different biochemical parameters. It was found that the most sensitive parameter in peripheral blood was ALAD as an effect indicator, whereas the concentration of protoporphyrin was not sensitive enough. In relation to these biochemical parameters in humans marked coincidence was found with these results.

Also in humans, we studied the effect of lead on iron metabolism, finding that there is an increase in the peripheral blood concentration of the latter in the lead intoxication. These results are in agreement with literature data referred to the lower biological use of iron due to enzyme inhibitions that lead produces in the heme pathway synthesis. Based on these data, it is possible to propose the peripheral blood iron concentration, as an effect marker of lead poisoning, which could be used in monitoring of occupationally exposed populations. Moreover, this determination is accessible to general clinical laboratories, because of the cost and the instruments required, and it is a complementary analysis to blood lead levels measurement, more sensitive than the data provided by the hematological study.

Keywords: lead, distribution model, lead accumulation, iron metabolism.

Índice

Índice general	Página.
Título	I
Agradecimientos	III
Resumen	IV
Índice de abreviaturas	X
Capítulo 1: Introducción	1
1.1- Definiciones	3
1.2- Reseña histórica	4
1.3- Características físicas y químicas del plomo	5
1.4- Plomo en el ambiente	6
1.5- Usos del metal	9
1.6- Consideraciones fisiológicas	10
1.7- Acción tóxica	12
1.8- Toxicodinámica	19
1.9- Toxicocinética	23
1.10- Niveles de plumbemia en nuestro medio	24
1.11-Bioquímica	25
1.11.1-Biomarcadores	26
1.11.2- Plumbemia y ALAD	27
1.11.3- Estudios en orina	27
1.11.4- Protoporfirinas	28
1.11.5- Ferremias	29
1.12- Modelos	30
1.12.1- Modelos PBPK/PD	31
1.12.2- Modelo de O'Flaherty	37
1.12.3- Modelo IEUBK	40
1.12.4- Modelo de Leggett	44
1.12.5- Modelo experimental: estudios preliminares	47
 Capítulo 2: Objetivos	 48
 Capítulo 3: Materiales y métodos	 50
3.1- Estudios en animales:	51
3.1.1-Animales	51
3.1.1.1- Procedencia	51
3.1.1.2- Aclimatación	51
3.1.2- Plomo	51
3.1.2.1- Determinación de la concentración y contenidos de plomo en las Muestras	51
3.1.2.2- Determinación del nivel sanguíneo basal de plomo	53
3.1.2.3- Determinación de plomo en el suelo del hábitat de los animales	54
3.1.2.4- Determinación de plomo en el agua utilizada en los experimentos	54
3.1.2.5- Determinación de Dosis Letales Medias (DL 50) de plomo	55
3.1.2.6- Experimentos de distribución compartimental en el sistema sanguíneo.	55
3.1.2.7- Distribución y acumulación del plomo en órganos	56

3.1.3- Parámetros bioquímicos	57
3.1.3.1- Determinación de la actividad de la δ -ALAD en sangre	57
3.1.3.2- Determinación de la concentración de la Protoporfirina Eritrocitaria Libre (PEL)	58
3.1.4- Parámetros hematológicos	59
3.1.4.1- Determinación del hematocrito	59
3.2- Estudios en Humanos	60
3.2.1- Muestras	60
3.2.1.1 Procedencia	60
3.2.2- Plomo	61
3.2.2.1- Determinación del nivel sanguíneo de Plomo	61
3.2.2.2- Determinación del nivel urinario de Plomo	61
3.2.3- Parámetros bioquímicos	61
3.2.3.1- Determinación de la concentración de la Protoporfirina Eritrocitaria Libre (PEL)	61
3.2.3.2- Determinación de la actividad de la δ -ALAD en sangre	62
3.2.3.3- Determinación de la concentración de hierro sérico (ferremia)	62
3.2.4- Parámetros hematológicos	63
3.2.4.1- Estudio hematológico	63
3.2.4.2- Examen microscópico del frotis sanguíneo	64
3.3- Modelo de distribución de plomo en <i>Rhinella arenarum</i>	64
3.4- Métodos estadísticos	65
Capítulo 4- Resultados	66
4.1- Estudios en <i>Rhinella arenarum</i>	67
4.1.1- Plomo	67
4.1.1.1- Determinación del nivel sanguíneo basal de plomo	67
4.1.1.2- Estudio del hábitat de los animales. Determinación del contenido de plomo en el suelo	70
4.1.1.3- Determinación del contenido de plomo en el agua utilizada en los experimentos, proveniente de distintas fuentes	71
4.1.1.4- Determinación de Dosis letales medias (DL50) de plomo	71
4.1.1.5- Experimentos de distribución compartimental del plomo en el sistema sanguíneo	74
4.1.1.6- Distribución y acumulación de plomo en órganos	82
4.1.2- Determinación de parámetros bioquímicos	85
4.1.2.1- Determinación de la actividad de la δ ALAD en sangre	85
4.1.2.2- Determinación de la concentración de la PEL	85
4.1.2.3- Determinación del hematocrito	86

4.2-Estudios en humanos	87
4.2.1- Plomo	87
4.2.1.1- Determinación del nivel sanguíneo y urinario de plomo	87
4.2.2- Parámetros bioquímicos	88
4.2.2.1- determinación de la actividad de la δ ALAD en sangre	88
4.2.2.2- Determinación de la concentración de la PEL	88
4.2.2.3- Determinación de la concentración de hierro sanguíneo	89
4.2.3- Estudio hematológico	90
4.2.3.1- Examen microscópico del frotis sanguíneo	91
4.3- Modelo de distribución de plomo	93
Capítulo 5- Discusión y conclusiones	95
5.1 Estudios en el modelo animal	96
5.1.1 Determinación del nivel sanguíneo basal	96
5.1.2 Plomo en el suelo	97
5.1.3 Determinación de la dosis letal de plomo y estudio del efecto de la temperatura	99
5.1.4 Distribución compartimental del plomo en el sistema sanguíneo de <i>R. arenarum</i>	100
5.1.5 Aspectos adversos del plomo sobre parámetros bioquímicos	102
5.1.6 Aspectos adversos del plomo sobre el sistema hematopoyético	102
5.1.7 Distribución y acumulación del metal en los órgano blanco	103
5.2 Estudios en humanos	105
5.2.1 Parámetros hemáticos en trabajadores expuestos al plomo	110
5.2.2 Estado de hierro	112
5.3 <i>Rhinella arenarum</i> como modelo de distribución de plomo en el organismo	118
Bibliografía	121
Anexo	141

Índice de abreviaturas utilizadas

Índice de abreviaturas utilizadas

ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists
Ac Na: acetato de sodio
Ac₂Pb: acetato de plomo
ADE: ancho de la distribución de tamaños eritrocitaria
ADME: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción de un tóxico
ALAD: ácido delta-levulino dehidratasa
ALAD-U: ácido delta-levulino dehidratasa en orina
ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry
C: grupo control
Ca CO₃: carbonato de calcio
CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media
CV%: coeficiente de variación porcentual
DE: desvío estándar
DL50: dosis letal media
EDTA: ácido etilen diamino tetracético
FDA: Food and Drug Administration
°C: grado centígrado
GR: glóbulos rojos
Hb: Hemoglobina
HCM: Hemoglobina corpuscular media
Hto: Hematocrito
N: número de individuos
Nf: número final de individuos
Ni: número inicial de individuos
NIOSH: U.S. National Institute for Occupational Safety and Health
NS: no significativo
NTP: National Toxicology Program
OMS: Organización Mundial de la Salud
OSHA: Occupational Safety and Health Administration
PEL: Protoporfirina Eritrocitaria Libre
ppm: partes por millón
SE: sangre entera
SF: suma de fracciones
T: grupo tratado
t_{1/2}: tiempo de vida media
U.S.EPA: Environmental Protection Agency
VCM: Volumen corpuscular medio eritrocitario

Introducción

La *calidad de vida* de los individuos que habitan en un determinado ecosistema, depende de la pureza del agua que se bebe, de la composición del aire que se respira y de los alimentos que se ingieren. Esto genera un interrogante acerca de si estos nutrientes que se toman del entorno son seguros, y por lo tanto, aptos para su consumo. Si el medio ambiente está contaminado y, en especial los elementos agua, aire, alimentos, lo están, entonces estos contaminantes serán incorporados al organismo por alguna de las vías de absorción y es probable que exista un efecto en todos los seres vivos, en corto, mediano o largo plazo.

Los metales son distribuidos naturalmente en el ambiente por ciclos geológicos y biológicos. En los primeros, son de gran importancia las erupciones volcánicas que remueven estos elementos de los estratos geológicos, la acción de la lluvia y el viento son importantes en la redistribución y transporte de estos elementos; las erupciones volcánicas pueden proyectar grandes masas de partículas a la atmósfera y luego son arrastradas por el viento para ser depositadas en lugares muy distantes de su fuente, la lluvia disuelve los mismos y los conduce a las proximidades de los ríos de forma tal que pueden ser movilizados largas distancias hasta llegar a depositarse en forma de sedimentos en los mares (Goyer y Clarkson, 2001). En los segundos, existen especies animales y vegetales que los incorporan desde el ambiente y, mediante ciclos alimenticios, ocurre la bioacumulación de los metales (Bernasconi et al., 2012).

Los elementos metálicos, han sido reconocidos como tóxicos desde hace siglos y probablemente hayan sido las más antiguas toxinas conocidas por los humanos (Goyer y Clarkson, 2001). La incidencia del envenenamiento por arsénico, cadmio, plomo y mercurio, es del mismo orden de magnitud que los más frecuentes errores congénitos del metabolismo como el hipotiroidismo, fenilcetonuria o que la incidencia de la hemocromatosis en adultos. El *screening* de estas enfermedades está indicado ya que son enfermedades tratables y porque, además, se reduce significativamente la morbilidad. Lo mismo puede decirse para los tóxicos metálicos, cuando se identifica tempranamente la enfermedad causada por la exposición a éstos, su tratamiento tiene buenos resultados; contrariamente si la exposición no es identificada, ocurrirán daños irreparables. El aluminio, provoca encefalopatía y demencia; el cadmio, enfermedad renal; el manganeso, parkinsonismo debajo de los 50 años; el mercurio, pérdida de peso, de la sensibilidad, de la audición, de la visión, cambios de comportamiento; el talio, aguda pérdida del cabello el arsénico, dolor que irradia desde el pie hacia la pierna (Moyer et al., 2006). En nuestro país, es relevante el Hidroarcenicismo Crónico Regional Endémico (H.A.C.R.E.) en el cual, las aguas de bebida resultan contaminadas naturalmente por arsénico en concentraciones (1000 y 3000 ppm) muy por encima del nivel permitido (10 ppm) por el Código Alimentario Argentino (2007) y que predisponen a enfermedades dermatológicas, cardiológicas y cáncer (PRECOTOX, 2011).

El plomo es el más abundante de los metales pesados en la corteza terrestre (Tong et al., 2000). La distribución del plomo en el ambiente, lo coloca entre las sustancias de potencial toxicidad, en especial en zonas cercanas a cierto tipo de industrias y en los alrededores de los grandes centros urbanos (exposición ambiental). Otro aspecto de relevancia, son las enfermedades profesionales de origen tóxico, donde el plomo es uno de principales agentes, siendo el saturnismo, la más frecuente intoxicación laboral (exposición ocupacional) debido a metales pesados en la actualidad (Piola y Prada, 1998).

El sapo, cuya denominación previa fue *Bufo arenarum*, posteriormente se la cambió a *Chaunus arenarum* (Frost et al., 2006) y actualmente a *Rhinella arenarum* (Chaparro et al., 2007), constituye un excelente modelo para los estudios ecotoxicológicos y en la evaluación del impacto ambiental debido a la contaminación con plomo, al ser una especie de relativa tolerancia al metal y por ser un anfibio, de modo que gran parte de su ciclo biológico transcurre en el agua (Fink y Salibián, 2005).

1.1-Definiciones

La *Toxicología* es la ciencia que estudia los mecanismos de ingreso, transformación y excreción de tóxicos, así como también los mecanismos a nivel molecular y celular, de producción de daños y desintoxicación. La descripción de estos procesos, tiene como objetivo principal entender las causas de la gran variabilidad que existe en la respuesta de los diferentes individuos y especies a la agresión química (Peña et al., 2001).

La *toxicología ambiental* estudia los daños causados en los seres vivos por la exposición a los tóxicos que se encuentran en el medio ambiente. Su objetivo principal, es evaluar el impacto que produce en la salud pública, el contacto de la población con los tóxicos ambientales presentes en un sitio contaminado (Peña et al., 2001).

Se define como *efecto tóxico o respuesta tóxica*, cualquier desviación del funcionamiento normal del organismo que ha sido producida por la exposición a una *sustancia tóxica*. Una *sustancia* se denomina *tóxica*, cuando al entrar en contacto con el organismo, produce un efecto perjudicial para el mismo, siendo peligrosa para la salud o la vida. Esto está íntimamente relacionado a la *dosis* de la misma, así una sustancia puede ser inocua a una cierta dosis y tóxica a otra.

Xenobiótico, en toxicología, es la sustancia tóxica que ingresa al organismo (Mateo Floria, 2007).

La *Dosis* está definida por la cantidad de xenobiótico a la que se expone el organismo y el tiempo durante el que estuvo expuesto. La dosis determina el tipo y magnitud de la respuesta biológica (Peña et al., 2001).

Los signos y síntomas, resultantes de la acción de un tóxico constituyen una *intoxicación* y, a la ciencia que estudia el diagnóstico y el tratamiento de las intoxicaciones en el Hombre se la denomina *Toxicología clínica* (Nogué Xarau, 1996). La *Toxicología laboral*, estudia las intoxicaciones producidas por agentes químicos utilizados en el trabajo, debido a su uso y manipulación. Tiene por objeto el estudio de las alteraciones biológicas y su toxicidad para evitar sus riesgos y efectos adversos sobre el organismo (Mateo Floria, 2007).

Blanco es el término que se utiliza para designar al tejido u órgano que recibe el impacto del tóxico y que presenta respuesta biológica correspondiente a la exposición. Se puede referir a una molécula (proteína, ADN, etc.) o a un órgano (hígado, riñón, cerebro, medula ósea, etc.). También se puede utilizar el término para designar a los individuos que han sido expuestos a un tóxico en un lugar determinado (Peña et al, 2001).

Genotoxicidad, se define como el daño en los genes causado por un tóxico.

Se denomina *vía de exposición* al *sitio* de ingreso o de contacto por medio del cual el tóxico se internaliza al organismo, siendo las vías principales aquellas ligadas a la ingestión, la respiración y el contacto cutáneo (Peña et al., 2001).

La *evaluación de la exposición* es un término general que incluye tanto la medición de las concentraciones de los contaminantes, como así también, el cálculo, la estimación y la elaboración de modelos sobre la base de los datos existentes (OMS, 2001). Los *biomarcadores o biomonitores de exposición* a un tóxico, son modificaciones a nivel celular y molecular que indican la presencia de contaminantes y son las primeras respuestas detectables a niveles subletales del tóxico (Porta, 2001). Los biomonitores de exposición ocupacional y medioambiental al plomo más utilizados son la medida de plumbemia y la actividad de la δ -ALAD, que es un indicador altamente sensible de exposición reciente al metal (Schuhmacher, 1997). Un *marcador biológico de efecto* en la salud, es un indicador de un componente endógeno del organismo o de un estado alterado del organismo, que se reconoce como un trastorno o enfermedad (OMS, 2000).

La *intoxicación aguda*, se produce por la exposición a una alta dosis de un tóxico o por la absorción rápida del mismo. La *intoxicación crónica*, se produce cuando

el tóxico penetra en pequeñas dosis pero repetidamente a lo largo de un período de tiempo (Mateo Floria, 2007).

1.2- Reseña histórica

Los efectos nocivos para la salud de ciertas sustancias tóxicas, se conocen desde la antigüedad y en especial, la de los metales. Tal es así, que el plomo ha sido uno de las primeras sustancias a las que se pudo asociar con su efecto tóxico. El mismo, se relacionó con su intoxicación hace 5000 años; hay referencias en el antiguo Egipto, del plomo como tóxico. En el Papiro de Ebers, 1552 a. de Cristo, se describe al plomo como un veneno. Hipócrates, en el siglo V a. de Cristo, estudió las causas ambientales de las enfermedades y describe el cólico saturnino como síntoma de la toxicidad del plomo (Padilla Magunazelaia et al., 1999).

Paracelso (1493-1541) describió muchos de los tóxicos conocidos, entre los que se cuenta el plomo (Soria et al., 1995).

El metal fue ampliamente utilizado en diferentes aplicaciones, desde la antigüedad (Tong et al, 2000), debido a sus propiedades. Los primeros vestigios de la utilización del plomo datan de los tiempos de los egipcios, luego se encontraron numerosos indicios de su conocimiento en la antigua India y en China, donde se lo obtenía como subproducto de la metalurgia de la plata; es juntamente con ésta que se difundió su uso en las civilizaciones mediterráneas. Todas las grandes civilizaciones han dejado muestras de su utilización, así por ejemplo, los romanos lo emplearon frecuentemente en sus acueductos; los babilonios lo usaron en obras de arte y en utensilios, como lo demuestran los elementos que se han hallado y que permiten admirar su desarrollo cultural.

1.3- Características físicas y químicas del Plomo

El plomo es un elemento metálico, de número atómico 82 y peso atómico 207,2. Pertenece al grupo IV del sistema periódico y en la naturaleza se lo encuentra en tres estados de oxidación: 0, +2 y +4. Su número usual de valencia es +2, que es el más comúnmente encontrado en las sales inorgánicas del metal, mientras que el estado +4 es el más importante en los compuestos orgánicos que contienen plomo y suelen ser bastante estables (Wilson Tabor, 1990).

El plomo está presente en la corteza terrestre en forma natural, en cuatro formas isotópicas, que por orden decreciente de abundancia son, ^{208}Pb (52%), ^{206}Pb (25%), ^{207}Pb (22%) y ^{204}Pb (1%). Los isótopos estables de plomo se forman a partir del decaimiento de la actividad de tres elementos radioactivos naturales: ^{206}Pb del uranio, ^{207}Pb del actinio y ^{208}Pb del torio (ATSDR, 2007).

El plomo es un metal de color gris azulado, de consistencia blanda, pesado debido a su alta densidad. Es dúctil y maleable, dado su bajo punto de fusión (327,5°C), con lo que puede ser seccionado fácilmente y también ser laminado y estirado, pero el agregado de pequeñas cantidades de elementos como arsénico, antimonio, cobre y metales alcalinotérreos aumentan su dureza. Es soluble en ácidos como el nítrico y los ácidos orgánicos, siendo resistente a la acción del sulfúrico. Cuando el metal es expuesto al aire o al agua, se forma en su superficie, una capa de sulfatos, óxidos y carbonatos de plomo que forman una barrera protectora frente a la corrosión (King y Ramachandran, 1995).

Casi todos los metales pesados se hallan en la naturaleza bajo formas químicas de baja solubilidad o de completa insolubilidad, especialmente en el caso del plomo, bajo la forma de sulfuros. Los principales compuestos químicos en los que se lo encuentra son: la galena (PbS), que contiene 86,4 % de plomo y la cerusita (PbCO₃), que contiene 77,5 % del metal. La anglesita es el sulfato de plomo (PbSO₄). La galena es el más importante de los minerales de plomo; la cerusita se forma por la oxidación superficial de la galena. (ATSDR, 2007)

1.4- Plomo en el ambiente

El Plomo es un tóxico cuya presencia en el medio ambiente representa un alto riesgo ecotoxicológico y sanitario (WHO, 1995), en especial teniendo en cuenta que es uno de los elementos de vida media más prolongada y desde el punto de vista de la Toxicología ambiental, su efecto supera a cualquier otro elemento metálico (ATSDR, 2007).

Se lo obtiene a partir de fuentes primarias, utilizando minerales del metal, y secundarias, a partir de residuos ricos en plomo como por ejemplo, el reciclado de baterías por fundición. Actualmente, la mayor parte del plomo proviene de fuentes secundarias, ya que por ejemplo, el 97% de las baterías son recicladas en los EEUU (ATSDR, 2005).

El plomo se halla comúnmente en la naturaleza, pero los grandes niveles del metal que se encuentran actualmente en el ambiente, está relacionado con actividades antropogénicas; se registraron aumentos en el orden de 1000 veces en los niveles de plomo respecto a medidas realizadas tres siglos atrás, y el gran aumento en la segunda mitad de siglo pasado, tuvo que ver con el uso masivo en las naftas (ATSDR, 2007). Es entonces, el ser humano quien con sus actividades, como la industrial, remueve dichos elementos de los depósitos naturales insolubles, convirtiéndolos en formas solubles; de esta manera, los metales pesados se dispersan en los diferentes compartimientos ambientales en los que pueden permanecer largos períodos de tiempo debido, como se mencionó

anteriormente, a su prolongada vida media ambiental (Fink y Salibián, 2005). Su presencia se pone de manifiesto por sus efectos tóxicos sobre la biota que habita esos sitios; la magnitud de los mismos depende de numerosos factores tales como: la dosis, los tiempos de exposición, las especies expuestas, estadio de desarrollo, etc.

Las áreas próximas a ciertas industrias (petrolera, extractiva, acumuladores, tintas y colorantes, cerámica, etc.) como ocurre en los grandes centros urbanos y suburbanos, se caracterizan por presentar elevadas concentraciones ambientales del metal; en este caso su origen es doble, la actividad industrial y el uso por décadas de combustibles adicionados con este metal, estando, en consecuencia, presente prácticamente en todos los compartimientos ambientales (aire, agua y suelo) (Albert y Badillo, 1991; Romieu et al 1997).

Para el agua potable, la Organización Mundial de la Salud sugiere, un límite de concentración del metal aceptable de $50 \mu\text{g l}^{-1}$ (OMS, 1993). En nuestro país, la Ley 24051 (1993) de Residuos Peligrosos, fija idéntica concentración, expresada como plomo total, para el nivel guía de la calidad de agua destinada a la bebida humana; así también lo establece el código alimentario argentino (ANMAT, 2010). Para la protección de vida acuática, en agua dulce superficial, la concentración máxima permitida se reduce al rango entre 1 y $7 \mu\text{g l}^{-1}$, según sea la dureza del agua (expresada como mg l^{-1} de CaCO_3). La FDA (2004) establece como concentración de plomo en agua embotellada, $5 \mu\text{g l}^{-1}$ y la U.S.EPA fija en $15 \mu\text{g l}^{-1}$ el límite aceptable para el agua potable, como promedio durante un período de tres meses (U.S. EPA, 2005a).

Existieron varios episodios en la argentina relacionados a la contaminación ambientales por plomo. Uno de los más resonantes, fue el originado por una planta fundidora de metales (Metal Huasi) en el pueblo de Abra Pampa de la provincia de Jujuy. Esta industria estuvo en actividad durante 3 décadas (1955-1987) y al cierre de la misma, dejó entre 15-20.000 toneladas de escombros con altas concentraciones de plomo. Como la población se formó en los alrededores de la metalera, estos desechos estaban separados de los habitantes del pueblo, solamente por un alambrado. Existieron denuncias ambientales incluyendo una resolución del Defensor del pueblo de la Nación (N° 13.316/99,) que exhortó a la Dirección de Medio Ambiente del Ministerio de Salud de la provincia de Jujuy, a garantizar la Salud de los habitantes del pueblo de Abra Pampa, pero solamente se utilizaron las montañas de escombros para la nivelación de terrenos, donde finalmente se instalaron nuevas viviendas e incluso una escuela. En el año 2006, un estudio de la Universidad de Jujuy (INQA, 2006), demostró que más del 80% de los niños poseían elevados niveles de PbS ($>10 \mu\text{g dl}^{-1}$) y el 16% excedía los $20 \mu\text{g dl}^{-1}$. En una nota periodística del año 2012, la maestra de la misma denunció la existencia de 13 casos de niños con cáncer.

La autoridad de la cuenca Matanza-Riachuelo (ACUMAR) en los últimos informes trimestrales disponibles (Tabla 1), reportó niveles de plomo en aguas superficiales que excedían los valores permitidos por nuestra ley para la protección de la vida acuática y para el agua potable, en diferentes mediciones realizadas sobre el curso principal del Río La Matanza- Riachuelo (ACUMAR, 2013a y 2013b).

Tabla 1. Concentración de plomo (en $\mu\text{g l}^{-1}$) medida en muestras de aguas superficiales, obtenidas en 11 sitios del curso principal del río La Matanza-Riachuelo (ACUMAR, 2013a y 2013b).

Estación del Curso principal	Agosto 2012	Diciembre 2012	Mayo 2013
1	4	2	5
2	4	7	8
5	3	ND	7
6	5	4	7
7	6	7	2
12	8	56	10
15	7	31	12
24	7	12	11
28	13	10	7
30	12	14	10
31	129	8	4

ND: no determinado.

En Estados Unidos, OSHA (2005) establece como límite legal de exposición permitido de plomo en el aire de $50 \mu\text{g m}^{-3}$ como promedio en un turno laboral de 8 horas; el NIOSH, recomienda un límite de exposición de $0,1 \text{ mg m}^{-3}$ como promedio durante un turno laboral de 10 horas (NIOSH, 2005); la ACGIH, recomienda un límite de $50 \mu\text{g m}^{-3}$ como promedio durante un turno laboral de 8 horas y remover del área de trabajo a todo trabajador que posea una concentración de plomo en sangre $\geq 50 \mu\text{g dl}^{-1}$ (ACGIH, 2004).

En relación a la alimentación, la FDA, establece en platos de cerámica y otros utensilios cerámicos, un máximo de 3 ug ml^{-1} ; en la vajilla plateada para uso de niños un máximo de $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$, siendo en adultos el límite en estos de $7 \mu\text{g ml}^{-1}$ (FDA, 2000).

El nivel de plomo en sangre, que es considerado índice de exposición biológica reciente es de $30 \mu\text{g dl}^{-1}$ en adultos (ACGIH, 2004), estando incluido en la clasificación de sustancias carcinogénicas y teratogénicas (U.S.EPA, 2005b). En el mismo sentido, se estableció el nivel de acción en niños $10 \mu\text{g dl}^{-1}$ (ATSDR, 2005).

En nuestro país, la Superintendencia de Riesgos de Trabajo, establece idénticos límites para los trabajadores expuestos a plomo: una concentración máxima permisible en aire de $50 \mu\text{g m}^{-3}$ y concentración de $30 \mu\text{g dl}^{-1}$ en sangre, como índice de exposición biológica. Para individuos expuestos debe realizarse el control periódico y en base a los resultados de laboratorio, se determinan distintas conductas terapéuticas (Tabla 2), destinadas a la protección de los trabajadores (Albiano, 2011).

Tabla 2. Conducta a adoptar en base a los resultados de plombemia en trabajadores expuestos (Albiano, 2011).

Concentración de Pb en sangre ($\mu\text{g dl}^{-1}$)	Control	Conducta terapéutica
< 30	semestral	
30 a 60	trimestral	Hasta normalización de valores y luego control semestral
60 a 80	a los 15 días Trimestral por 6 meses Luego semestral	Alejamiento de la exposición. Si no normalizó al alejar de la fuente y sin tratamiento, repetir control. Si existió tratamiento, el médico debe decidir conducta a seguir. Luego al reintegrarse al trabajo, control trimestral durante 6 meses y luego semestral
> 80	A los 15 días Trimestral por 6 meses Luego semestral	Con o sin síntomas reversibles de enfermedad. Alejamiento de la exposición, control clínico y de laboratorio a los 15 días de terminado el tratamiento, evaluando el conocimiento de normas de seguridad e higiene en los trabajadores afectados. Luego al restablecer su trabajo, control trimestral durante 6 meses y posteriormente semestral
>80	Según tratamiento y controles posteriores. Trimestral durante 1 año	Con síntomas de enfermedad. Alejar de la fuente de exposición e instaurar un tratamiento y control clínico, neurológico y miológico, evaluando la factibilidad de recalificación laboral. En caso de restablecimiento laboral, luego de evaluar el ambiente laboral y las prácticas de higiene, control trimestral durante 1 año.

1.5- Usos del metal

El plomo en la industria es ampliamente utilizado por sus múltiples propiedades, fundamentalmente por su capacidad para extenderse en láminas (maleabilidad) y propiedades rédox, de gran importancia en la fabricación de acumuladores o baterías para automóviles. Otras aplicaciones importantes son la producción de tetraetilplomo utilizado como antidetonante en naftas (actualmente restringida a la aeronáutica), fundas para cables, materiales para la construcción, soldaduras y fundición de metales, artículos de plomería como tubos y canillas, vidrios de color, cerámicas, pigmentos y pinturas, municiones, artículos de pesca, juguetes y elementos de protección contra la radiación en computadoras, televisores y

equipo médico (Tong et al., 2000). En relación a esto, se puede vincular cada una de las utilidades del plomo con una causa de contaminación para el trabajador o para con el medio ambiente. Se ha medido el plomo en niños considerando la proximidad de la vivienda respecto de una fundición de plomo, encontrándose una correlación positiva entre los niveles de plomo en sangre y el contenido del mismo en el polvo intradomiciliario y en la tierra de patios o jardines. También se observó que los hijos de trabajadores de fábricas, tienen niveles mayores en su organismo, debido a que sus padres lo transportan a su domicilio en su cuerpo o en su vestimenta (Ordóñez et al., 2003).

La pintura de casas anteriores a la década del '70, era fabricada en base de plomo, y en viviendas antiguas, esto constituye un serio problema en el momento del reciclado de las mismas, debido a que todas las acciones, como el lijado de las paredes, liberan partículas de plomo en polvo al aire, pone en peligro a quienes tienen mayor riesgo de intoxicación con el metal: bebés y niños que viven en dichas casas. Además, el plomo puede encontrarse, en estas viviendas, en el agua de bebida ya que los caños, soldaduras y canillas, contienen el metal (ATSDR, 2007).

El plomo orgánico (principalmente en la forma de tetraetilo de plomo), al ser usado en naftas, permitió su masiva dispersión en el ambiente (O'Flaherty, 1995), con lo que aún se encuentran altos niveles del metal en los suelos próximos a las autopistas, rutas y en las grandes urbes. Finalmente, este uso del plomo en los combustibles fue limitado hacia fines de la década del ochenta, y prohibido hacia fines de siglo; en la Argentina, la Secretaría de Energía prohibió el uso de estos aditivos en la nafta súper, en el año 1996, en todo el territorio del país.

En EEUU, durante 1979 los automóviles liberaron a la atmósfera 94,6 millones de kg de plomo al aire y, en 1989 cuando se restringió su uso, se liberaron solamente 2,2 millones (ATSDR, 2005). Recientemente, se ha detectado una disminución en los niveles de plomo en sangre comparados con los de 1995, en relación a la reducción del uso del metal como aditivo en combustibles (Strömberg et al, 1995, 2003 y 2008; Iqbal et al, 2008).

Por otro lado, el plomo orgánico fue utilizado también en plaguicidas de uso masivo en huertas frutales antes del 1950 (ATSDR, 2005).

1.6- Consideraciones Fisiológicas

Los compuestos inorgánicos, especialmente los iones de los metales, tienen un doble rol en la fisiología, mientras algunos son indispensables para la vida (esenciales), cumpliendo importantes funciones en el organismo, otros pueden llegar a ser tóxicos, dependiendo de la dosis; sin embargo a dosis altas son todos tóxicos. Luckey y Venugopal (1977) denominaron *hormetinas* a todas aquellas

sustancias que absorbidas a pequeñas dosis ejercen un efecto beneficioso para los procesos fisiológicos, pero que a dosis más altas o cuando dosis bajas repetidas originan concentraciones tisulares elevadas dan lugar a efectos tóxicos. Por otro lado, la toxicidad de los elementos metálicos es mayor en la forma iónica y no metálica (Soria et al, 1995).

El cuerpo humano utiliza elementos de alto peso atómico en muy pequeñas cantidades, generalmente en concentraciones de trazas y como se dijo con anterioridad, esto es porqué a mayores concentraciones resultan tóxicos y su acumulación provoca una serie de cambios y alteraciones estructurales y funcionales sobre enzimas, proteínas y, en especial, sobre los cromosomas o el ADN lo cual origina genotoxicidad (Tabla 3), carcinogénesis, teratogénesis y la muerte celular (ATSDR, 2007; NTP, 2004).

Tabla 3. Estudios reportados sobre genotoxicidad del plomo *in vivo* (ATSDR, 2007)

Especie	Punto final	Resultado	Referencia
Drosophila melanogaster	Pérdida o no disyunción del cromosoma	-	Ramel and Magnusson, 1979.
Médula ósea de ratón, médula ósea de rata, leucocitos de ratón, linfocitos de mono, conejo.	Aberraciones o lagunas cromosómicas estructurales, formación de micronúcleos, síntesis de ADN no programada, intercambio de cromátidas hermanas	±	Bruce and Heddle, 1979; Deknudt and Gerber, 1979.
		+	Deknudt et al, 1977
		+	Jacquet and Tachon, 1961
		-	Jacquet et al, 1977
		-	Muro and Goyer, 1969
		+	Tachl et al, 1985
		-	Willems et all, 1962

		+	Jagefla and Aruna, 1998
Trabajadores de la industria del plomo, linfocitos periféricos	Micronúcleos	+	Vaglenov et al, 2001
		+	Vaglenov et al, 1998
Trabajadores de la industria del plomo, linfocitos periféricos	Daño en el ADN	+	Danadevi et al, 2003
		+	Fracasso et al, 2002
Trabajadores de la industria del plomo, linfocitos periféricos	Aberración cromosómica	+	Al-Hakkak et al, 1986
		+	Forni et al, 1976
		-	Maki-Paakkanen et al, 1981
		+	Nordenson et al 1976
		-	O’Riordan and Ewans 1974
		+	Schwanitz et al, 1975
		+	Huang et al, 1988b
Niños, población en general	Aberración cromosómica	-	Bauchinger et al, 1977
Adultos, población en general	Aberración cromosómica	-	Bulsma and De France, 1976
Trabajadores de la industria del plomo, linfocitos periféricos	Intercambio de cromátidas hermanas	±	Grandjean et al, 1983
		-	Maki-Paakkanen et al, 1981
		+	Huang et al, 1988b
		+	Duydu et al, 2001
		+	Wu et al, 2002
Niños, población en general	Intercambio de cromátidas hermanas	-	Dalpra et al, 1983
Adultos, población en general	División celular alterada	+	Bulsma and De France, 1976
Trabajadores de la industria del plomo, linfocitos periféricos	División celular alterada	+	Sarlo et al, 1978
		+	Schwanitz et al 1970

- : Resultado negativo

+: Resultado positivo

±: No concluyente

ADN: Ácido desoxirribonucleico

El plomo no es un nutriente, ni cumple rol fisiológico alguno en el organismo (Rodríguez y Espinel, 2008), sin embargo se lo encuentra en los tejidos y en sangre de los individuos, especialmente aquellos que habitan en países industrializados; esa presencia del metal se debe a la incorporación del mismo desde el medioambiente. Esto ha hecho que se formule el concepto de concentración “normal” de plomo en sangre (Piomelli y Corash, 1980). Estudios realizados en glaciares demostraron que el plomo como contaminante ambiental tiene importancia a partir de principios del siglo XX, hecho que coincide con la aparición de las naftas con tetraetilo de plomo, formuladas en 1921 por Thomas Midgley Jr., y a partir de la revolución industrial (Murozumi, 1969).

Se calcula que la mitad del plomo producido industrialmente, se libera al ambiente como contaminante. La producción anual mundial del metal es de aproximadamente 3.4 millones de toneladas métricas de las cuales 1.6 millones se liberan al ambiente (NRC, 1993).

La aparición de técnicas más sensibles de medida, ha permitido la detección de plomo en bajas concentraciones, en todos los individuos sanos. Se han realizado estudios para determinar el plomo “normal” en poblaciones sanas, siendo esta denominación inadecuada ya que, como se mencionó anteriormente, el metal no cumple ningún rol fisiológico. Una aproximación a esto, se realizó midiendo los niveles del metal en poblaciones aisladas o protegidas geográficamente (Tabla 4).

Tabla 4. Estimación de los niveles de plomo en la Era preindustrial.

Fuente	Población	Plombemia ($\mu\text{g dl}^{-1}$)
Patterson, 1965	Era Pre-industrial (por cálculo)	0,2
Hecker et al., 1974	Indios Yanomano	0,83
Piomelli et al., 1980	Himalayas	3,4
Flegal y Smith, 1992	Era Pre -industrial (por cálculo)	0,21

1.7- Acción tóxica

En la actualidad, como la mayoría de los elementos metálicos, el plomo produce rara vez intoxicación aguda pero sí se lo asocia a intoxicaciones crónicas. El metal es un importante contaminante industrial y doméstico, representando un gran riesgo toxicológico y medioambiental (WHO, 1995; Tong et al., 2000). Las principales fuentes de exposición son: la combustión de naftas, la emisión industrial, la alimentación y la laboral. En países desarrollados, se ha reportado la disminución de concentraciones de plomo en sangre debido a la implementación de leyes destinadas a la protección medioambiental (ATSDR, 2007).

En los vertebrados que han estado expuestos al plomo, puede medirse el metal en la sangre, en tejidos y órgano blanco tales como el nervioso (central y periférico), riñón, bazo y hueso. En la intoxicación por plomo (saturnismo) se encuentra afectado el funcionamiento de una serie de sistemas fisiológicos, incluyendo el renal, el cardiovascular, nervioso, reproductor, endocrino, inmunológico y hematopoyético (Fink y Salibián, 2005).

Los efectos del plomo en animales vertebrados, con excepción de los mamíferos, son poco conocidos (Linder y Grillitsch, 2000). Se han publicado trabajos que muestran evidencias concretas acerca de la acumulación del metal en anfibios (Arrieta et al., 2001; Rice et al., 2001, 2002). Debido a su ciclo bifásico, los anfibios están expuestos al plomo tanto en medio acuático como en el terrestre (Fink y Salibián, 2005). El metal produce diversos efectos tóxicos en anfibios sobre el sistema hematológico como la disminución en el recuento de glóbulos rojos y el incremento del recuento de leucocitos (Rosemberg et al., 2003) así

como también, los cambios a nivel bioquímico en la actividad de ALA-D (Arrieta et al., 2000b) y el aumento en la concentración de PEL (Arrieta et al., 2004).

Recientemente, Bazar et al. (2010), han encontrado una reducción entre un 15 y un 80% en la supervivencia de salamandras (*Plethodon cinereus*) expuestas a suelos tratados con concentraciones de 4700 y 9167 mg kg⁻¹ de Pb, respectivamente. En los animales expuestos, hallaron inapetencia a las mencionadas concentraciones, reducción del crecimiento en el suelo tratado con la mayor concentración del metal y también, una disminución en el recuento total de las células blancas de la sangre, de 32 % y 22 % en comparación con el grupo control para las concentraciones ensayadas. Wang y Jia (2009), estudiaron los efectos crónicos que producen las bajas concentraciones de plomo, en especial, por daño oxidativo sobre el ADN extraído de testículos de *Rana nigromaculata*. Encontraron un aumento significativo de los niveles de malonaldehído (MDA) en todos los grupos de tratamiento con plomo y en los niveles de glutatión a concentraciones de 0,2-1,6 mg l⁻¹ Pb, en relación a los grupos control (p < 0,01). En el tratamiento con Pb a concentraciones > 0,4 mg l⁻¹ también aumentó tasa de daño en el ADN midiendo parámetros como el momento de la cola (TM) y la longitud de la cola (TL), registrando un aumento de los mismos cuando el nivel de Pb era > 0,2 mg l⁻¹ (p < 0,01 para TM, p < 0,05 para TL). Los resultados de las mediciones de MDA indican que el efecto en el ADN de testículos de *R. nigromaculata* era posiblemente debido al daño oxidativo inducido por el metal.

Varios efectos tóxicos del plomo se han documentado en los anfibios, pero pocos estudios han medido niveles en los tejidos de especímenes expuestos o se ha examinado la toxicocinética, la disponibilidad en la dieta en las fuentes como el agua, u otra vía de entrada. Rice et al. (2001), estudiaron la toxicocinética y evaluaron la disponibilidad de plomo en la dieta y en el agua en larvas rana toro (*Rana catesbeiana*) alimentadas o privadas de alimentos y expuestas a una concentración de Pb de 1000µg l⁻¹. Las tasas de captación del metal, fueron similares entre ambos grupos, pero las larvas no alimentadas eliminaron Pb lentamente. En consecuencia, las larvas privadas de alimentos acumularon significativamente más Pb en comparación con larvas alimentadas. El tracto intestinal contenía > 90 % del total del metal corporal tanto en larvas alimentadas y sin alimentar. Las concentraciones corporales totales de Pb en las larvas alimentadas no aumentaron durante 7 días aunque los niveles del metal en los alimentos sí se aumentó, por lo que concluyeron que la influencia del consumo de alimentos y la acumulación Pb fue a través de cambios en las tasas de eliminación y no en las tasas de absorción. Controlando la concentración de Pb en el agua y en los alimentos, llegaron a la conclusión que el mismo ingresaba en el cuerpo de las larvas a través de la ingestión de agua principalmente.

El mismo autor, informó de la existencia de cambios durante la metamorfosis de anfibios, tanto morfológicos como fisiológicos, debido a los efectos tóxicos crónicos del plomo. En una experiencia de 14 semanas, midió cambios en la acumulación de plomo en el cuerpo entero, tracto intestinal y en hígado de *R. catesbeiana*. Al exponer las larvas a una concentración de Pb en agua de $1049 \pm 406 \mu\text{g l}^{-1}$, reportó la disminución en el crecimiento de los individuos y en la duración de la metamorfosis. Una probable explicación de estos hallazgos es la disminución en el apetito y la inducción de daños histológicos en el intestino (Rice et al., 2002).

En nuestro país, Sandoval et al. (2004) estudiaron los efectos sobre embriones del sapo *Rhinella (Bufo) arenarum* al exponerlos a concentraciones de plomo de 10, 20 y 30 mg l⁻¹. Los organismos expuestos a 10 y 20 mg l⁻¹ de Pb sobrevivieron en un 96,6% en comparación con un grupo control y presentaron retraso en el desarrollo, falta de crecimiento de la aleta dorsal y ventral de la cola, escaso desarrollo de las branquias externas y menor talla que los controles. En los individuos tratados con 30 mg l⁻¹ de Pb, se observó una letalidad del 63 % y mostraron a las 72 horas de exposición, detenimiento del desarrollo, falta de crecimiento longitudinal e incurvaciones del eje cefalo-caudal. La magnitud de los efectos adversos agudos ocasionados por el plomo sobre larvas del sapo, dependieron de las concentraciones ensayadas y se manifestaron como letalidad y alteraciones en el desarrollo. Concentraciones de 30 mg l⁻¹ resultaron altamente letales ocasionando un pronunciado detenimiento en el desarrollo larval. Concentraciones inferiores a la mencionada, si bien no resultaron letales, provocaron severas alteraciones en el desarrollo de órganos esenciales para la vida de los renacuajos, como ser las branquias externas y la cola.

En humanos, el plomo ejerce su efecto tóxico principal sobre los sistemas nervioso, gastrointestinal y hematológico. Sin embargo, la exposición severa o prolongada al metal puede originar también nefropatía crónica e insuficiencia reproductiva (Locktich, 1993).

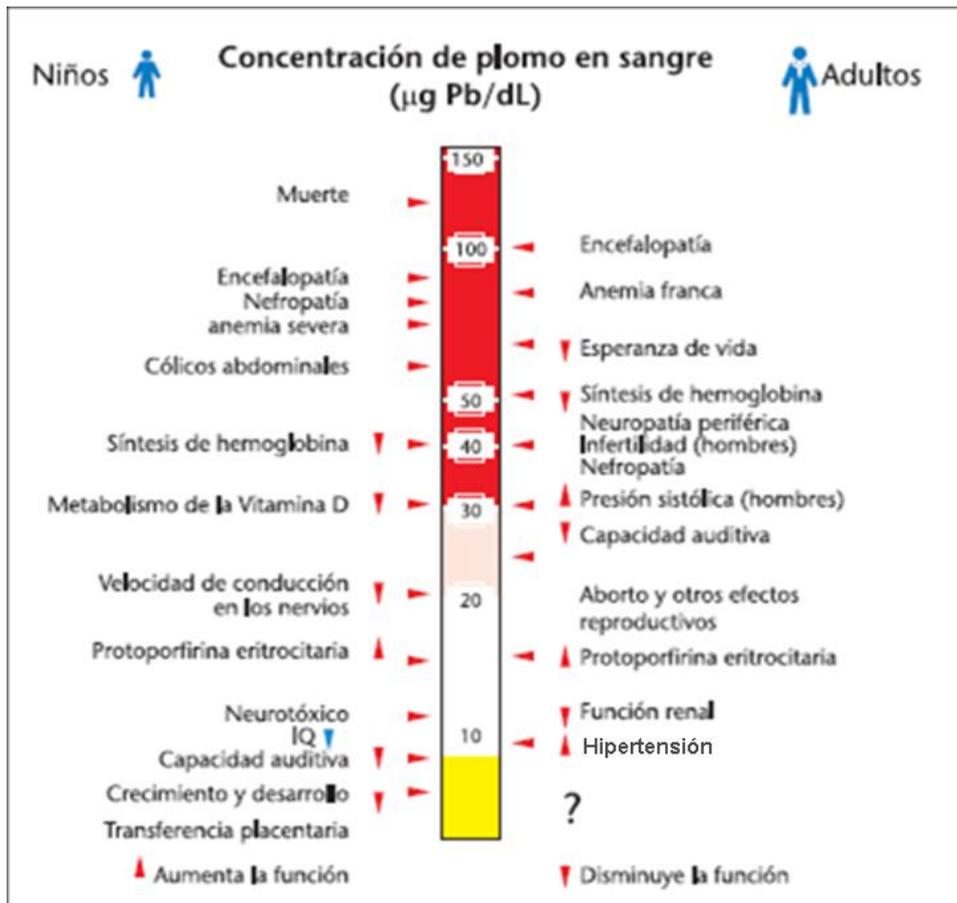
Una exposición menos severa al plomo esta relacionada con infertilidad (o pérdida de embarazos) (CDC, 2012), problemas en el desarrollo físico (CDC, 2007) y neurológico (Braun et al, 2006) en niños e hipertensión en adultos (Schartz, 1991). Estos síntomas y signos pueden hacer que muchas veces se subdiagnostique la enfermedad, debido a la poca especificidad de los mismos (Valdivia Infantas, 2005) y, es por ello, que la intoxicación por plomo debe descartarse en todos los pacientes que presenten hipertensión arterial, hiperuricemia, gota e insuficiencia renal crónica (Fernández-Fernández, 2002).

La exposición al plomo, ha sido asociada con el daño al material genético en trabajadores expuestos de una fábrica de baterías comparado con el ADN de

linfocitos de individuos no expuestos (Fracasso et al., 2002). En general, el daño en el ADN, se correlaciona con el tiempo de exposición y la concentración de plomo en sangre (ATSDR, 2007). Nordenson et al. (1978) reportaron un incremento significativo en las aberraciones cromosómicas de los linfocitos de sangre periférica, en un grupo de 26 trabajadores expuestos al plomo, que tuvieron un nivel de plumbemia media de $65 \mu\text{g dl}^{-1}$. Por otra parte, se obtuvieron hallazgos similares a concentraciones de Pb en sangre entre 40-80 $\mu\text{g dl}^{-1}$ (Schwanitz et al., 1970; Forni et al., 1976; Al-Hakkak et al., 1986; Huang et al., 1988).

La intoxicación con plomo, ya sea aguda o crónica puede presentarse con una serie de signos y síntomas, que pueden ser diversos, así como también alteraciones a nivel químico molecular (Figura 1). Estas manifestaciones pueden presentarse o no. Por ejemplo, entre los síntomas y signos leves pueden encontrarse: cansancio, falta de energía, constipación, leve malestar abdominal, anorexia, alteración del sueño, irritabilidad, anemia, palidez y con menos frecuencia diarrea y náuseas; los síntomas y signos severos incluyen cólicos, diarrea, vómitos, astenia, disminución de la potencia muscular, hiperestesia muscular, parestesia, síntomas psicológicos que incluyen irritabilidad, alteraciones del comportamiento y neuropatía o encefalopatía (Lane, 1968).

Figura 1. Efectos biológicos observados según el nivel de plomo en sangre (Valdivia Infantas, 2005)



Una de las causas más comunes de saturnismo está relacionada con la exposición profesional como ocurre en la minería, plomería, la construcción de barcos, albañilería, fundiciones de plomo para el reciclado del metal, trabajadores de la industria de acumuladores (baterías de autos) y en demoliciones. Es de gran interés la intoxicación en poblaciones laboralmente expuestas, ya que el plomo produce la enfermedad profesional por metales más frecuente en el mundo y, en nuestro medio, es la enfermedad laboral de origen tóxico más frecuente (Piola y Prada, 1998). Las personas que están expuestas laboralmente al plomo, generalmente lo están por inhalación de aire que contiene al metal particulado (ATSDR, 2005).

Existen dificultades en la detección de esta enfermedad laboral, en primer lugar por presentar signos y síntomas que son inespecíficos y similares a otras patologías no laborales mencionadas anteriormente. Por otro lado, el período de latencia existente entre la exposición y la aparición de las manifestaciones clínicas, sumados al hecho que no todos los médicos tienen el entrenamiento adecuado para su detección (Piola y Ezpeleta, 1998).

La persistencia de pinturas elaboradas con plomo en hogares antiguos constituye un riesgo para los niños, debido a sus hábitos de llevarse objetos a la boca,

conocido como pica (O'Flaherty, 1991). La pica es un desorden alimentario que está relacionado a deficiencias nutricionales (CNH, 2009). También son importantes causas de intoxicaciones esporádicas o epidémicas las debidas a preparados medicinales caseros, cosméticos, suplementos vitamínicos, utensilios para preparar alimentos, fórmulas para infantes preparadas inadecuadamente (Locktich, 1993).

En 1988, entre 3 y 4 millones de niños en los Estados Unidos estaban en riesgo de padecer efectos adversos por poseer niveles elevados de plomo en sangre. En 2007, gracias a las políticas adoptadas, se logro una reducción importante de esta cifra y cerca de 310.000 niños entre 1 y 5 años presentaron niveles de plomo en sangre superiores a $10 \mu\text{g dl}^{-1}$ (ATSDR, 2007).

Los niños tienen mayor susceptibilidad a los efectos tóxicos del plomo, por efectos del “metabolismo” del plomo en los mismos, es decir, por las diferencias en la absorción intestinal, el metabolismo óseo, y el rápido desarrollo del sistema nervioso que son característicos de ellos. La absorción de plomo en niños es aproximadamente 5 veces superior que en adultos, debido a diferencias en factores que predisponen a su absorción como el ayuno, la deficiencia de hierro y la ingesta inadecuada de calcio (Mahaffey, 1990).

El paso que sigue a la absorción del plomo es su distribución en dos compartimientos principales: la sangre donde cerca del 95% está dentro de los eritrocitos, y tejidos blandos como el hígado, los riñones y el cerebro, en los cuales los niveles de plomo son independientes de la edad. Los niveles de plomo en sangre representan exposición reciente al tóxico (Mushak y Crocetti, 1989).

La intoxicación por plomo metálico puede producirse por vía oral, pero la vía inhalatoria es la más importante para su absorción, así los vapores o partículas de plomo, tras penetrar por el epitelio pulmonar, llegan a circulación y viajan en el plasma como fosfato de plomo. Se deposita en el hígado, pulmones, encéfalo, huesos y riñones. Se elimina por orina y en menor proporción por materia fecal (ATSDR, 2007).

Si bien la intoxicación aguda con metales pesados como el plomo es infrecuente en nuestros días, la medición en plasma y orina están indicados para confirmar el diagnóstico. Habitualmente las medidas de plomo en servicios de urgencia son muy poco frecuentes, pero en caso de sospecha de severa intoxicación su determinación está justificada (Tong et al, 2000).

Se han observado manifestaciones clínicas de diversos tipos y efectos muy inespecíficos que muchas veces suelen desorientar el diagnóstico médico, como efectos sobre el sistema renal, mialgias, disminución de la espermatogénesis y

trastornos menstruales. Sobre el sistema gastrointestinal, pueden presentarse estreñimiento, dolores abdominales, diarrea, anorexia y hepatopatías.

Los mecanismos fisiopatológicos del plomo en humanos son los siguientes:

- **Disminución de la síntesis del grupo HEMO** en los eritroblastos de médula ósea, al inhibir 3 enzimas de la ruta biosintética de este grupo (D aminolevulínicodehidratasa, coproporfobilinógeno oxidasa y ferroquelatasa.). Sobre la hematopoyesis produce anemia normocítica e hipocrómica, por lo que el individuo presentará astenia y debilidad (Piomelli, 2003).
- **Daño del Sistema Nervioso.** Produce lesiones neuronales difusas, vaso dilatación y extravasación de líquidos en encéfalo. A nivel del SNP hay desmielinización del asta anterior de la medula y, más tarde, puede aparecer atrofia y degeneración axonal de las fibras nerviosas. La exposición a cantidades excesivas de plomo, produce lesiones y efectos adversos en la función cerebral y estos efectos son mayores en la niñez, donde ocurre el desarrollo de las sinapsis nerviosas (Goldstein, 1990). Se encontró déficit en el coeficiente intelectual de niños a los 24 meses de edad, que tuvieron niveles de plomo elevado en la sangre de cordón (Needleman, 1995). Se encontraron lesiones en la materia blanca de cerebro de personas que trabajaron en la industria y estuvieron expuestos al metal, mientras más elevados niveles de plomo, más propensos a tener menores volúmenes cerebrales y mayores extensiones de daño cerebral, con lo que las dosis acumuladas de plomo conducen a lesiones cerebrales persistentes y que explican la declinación de la función cognitiva (Stewart, 2006). El plomo en dosis silentes, produce déficit psicológicos, en la inteligencia, percepción, atención, función del lenguaje y, tal vez, en el comportamiento social (Needleman, 1995). Los efectos observados son irritabilidad, alteraciones de la memoria, cefalea, convulsiones, dificultad en la concentración, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) especialmente en niños (Braun et al, 2006; Rowland, 2006).
- **Elevada tensión arterial** en varones, lo cual conlleva al incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular. Tal es así que se confirmó en dicho estudio, la asociación significativa entre el plomo y la hipertrofia ventricular derecha, lo cual suma evidencias a la elevada presión arterial en estas personas (Schwartz, 1991). Otros datos que apoyan esta conclusión son: la depleción del óxido nítrico (NO); el aumento de noradrenalina plasmática; la activación del eje renina-angiotensina-aldosterona (Carmigiani et al., 1988); los efectos sobre la contracción de la musculatura vascular dada por la inhibición de la actividad Na-K-ATPasa

y la asociación con el incremento del Ca intracelular con la posible activación de la Proteínquinasa C (Hwang et al, 2001).

- ***Alteración de la función renal.*** Puede provocar esclerosis y fibrosis renal con nefritis crónica. La disminución de la función renal, se asoció con la concentración de plomo en la tibia de los pacientes, y se encontró que en diabéticos e hipertensos fue mayor que el de los pacientes no diabéticos y de presión sanguínea normal (Tsaih et al., 2004).
- ***Alteración del metabolismo óseo.*** Se deposita en huesos, reemplazando al calcio en la estructura cristalina y puede permanecer en ellos con una vida media de 25 a 30 años, donde puede actuar como fuente de exposición endógena (Sanin, 1998).

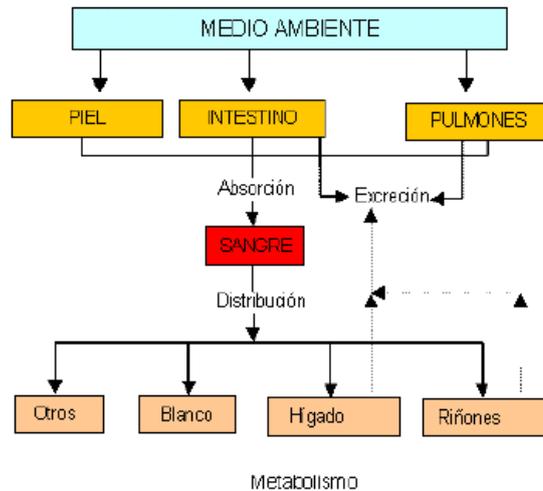
1.8- Toxicodinámica

Para que un tóxico provoque un daño, se deben cumplir dos condiciones: se debe estar expuesto durante un tiempo determinado y se debe alcanzar una cierta concentración del mismo en el organismo (Peña et al, 2001).

El organismo cuenta con una serie de barreras con las cuales se defiende o se protege del medioambiente que lo rodea. El tóxico deberá vencer entonces estas defensas para llegar al tejido blanco y así, causar algún efecto perjudicial. La manera en que estos mecanismos de defensa actúan, se basan en la inmovilización del tóxico (donde el tejido óseo cumple un importante rol) y en la disminución del período de exposición al mismo. El efecto del tóxico dependerá de la cantidad que llegue en estado activo al sitio blanco y del tiempo de permanencia en este lugar. Un problema que se estudió, son ciertas condiciones fisiológicas, como el embarazo, y patológicas, como en la osteoporosis, que favorecen la resorción ósea y por consiguiente la liberación, en grandes cantidades, del plomo inmovilizado en el tejido óseo (Sanin, 1998).

El proceso de transporte y transformaciones que experimenta un tóxico desde los lugares de contacto hasta los sitios blanco y de almacenamiento, consta de cuatro etapas: **Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción** y es conocido como proceso **ADME**. En la Figura 2, se ilustra el recorrido de un tóxico que al ingresar al organismo, proveniente del Medio-ambiente, es absorbido y pasando a sangre se distribuye para finalmente localizarse en el órgano blanco donde ejercerá su acción tóxica.

Figura 2. Rutas que sigue un tóxico en el organismo (Peña et al., 2001).



Absorción: es el proceso por medio del cual un tóxico penetra en el organismo atravesando las membranas de los diferentes epitelios y tejidos subyacentes hasta llegar al torrente sanguíneo.

Desde la prohibición de su uso en naftas, las vías más importantes de absorción de plomo, son la ingestión por vía oral y la inhalación (González Estrecha et al, 2009).

Ingestión por vía oral: se absorbe aproximadamente el 10 % del plomo que se ingiere (Soria et al, 1995). El mismo proviene de diversas fuentes como el agua de bebida, especialmente en viviendas antiguas con cañerías de plomo, recipientes de cocina esmaltados con el metal, ingesta de pintura en polvo desprendida de las paredes; se han descrito intoxicaciones alimentarias en poblaciones indígenas, cuya dieta está basada en animales de caza, que resultan contaminados con los propios proyectiles, perdigones y balas utilizadas (Durlach et al., 1986; Madsen et al., 1988; Cox y Pesola, 2005) (Figura 3). También existen otras causas importantes de intoxicaciones por motivos mencionados en el apartado anterior: la intoxicación por la leche materna resulta una vía de importancia en lactantes, dado que es la única ingesta en esta población, y en mujeres que han estado expuestas previamente al plomo, en este período, existe un remodelamiento de los depósitos óseos del metal (Ettinger et al, 2004).

En niños es especialmente importante esta vía de absorción por dos motivos principales: primeramente por los hábitos de pica de pintura en casas antiguas o de juguetes (Ruiz-Gil, 2001) y en segundo lugar por que la absorción del metal es 5 veces mayor que en los adultos (Piomelli, 2003).

Inhalación: el plomo que llega a los pulmones en forma de partículas especialmente de polvo, o aerosoles, se absorbe en aproximadamente el 30% del metal inhalado.

Absorción cutánea: ocurre sólo en los compuestos orgánicos del plomo como el tetraetilplomo. Habitualmente, la exposición es laboral y ocurre en los trabajadores de las estaciones de servicio, por la manipulación de combustibles y mecánicos por hábitos de lavarse las manos con naftas.

Figura 3. Imagen radiográfica del apéndice de un individuo, repleto de balas de plomo, proveniente de la ingestión de carne de animales cazados. (Cox y Pesola, 2005).



Distribución: es la localización y concentración del tóxico en los diferentes tejidos del organismo.

El plomo es transportado por la sangre, especialmente dentro de los glóbulos rojos para acumularse en los distintos tejidos, principalmente en huesos, riñones, hígado, músculos y en cerebro. El plomo circula en sangre periférica transportado por los hematíes en un 95%, circulando con lentitud y depositándose en diversos órganos en especial en hueso en un 90% (Nordberg, 1991) donde constituye una fuente de exposición endógena (Sanin, 1998).

Metabolismo: es el proceso en el cual un tóxico es modificado o biotransformado, para impedir su efecto tóxico y facilitar la eliminación del organismo.

La biotransformación se realiza sobre compuestos orgánicos. Uno de los mecanismos de defensa es la formación de inclusiones intranucleares de proteínas y plomo en forma no difusible, que se han hallado en células renales (Soria et al., 1995).

También la inducción de la síntesis de metalotioneínas, que son biomarcadores tempranos de contaminación y constituyen una respuesta específica a la exposición por metales (Porta, 2001). Las metalotioneínas son proteínas citosólicas de bajo peso molecular, ricas en aminoácidos azufrados y cuya síntesis es estimulada por la presencia de metales como el plomo. La síntesis de proteínas ricas en aminoácidos azufrados es un importante mecanismo de resistencia al plomo (Soria et al., 1995), así como también la inmovilización del metal en hueso.

Se ha informado que la enzima ALA-D intraeritrocitaria, une plomo con alta afinidad y que por lo tanto, es responsable del transporte del metal en sangre y de la gran diferencia de concentración respecto al plasma (Sakai et al., 1982). Se han descrito dos alelos del gen para ALA-D, denominados ALAD1 y ALAD2, que estarían relacionados con la diferente susceptibilidad a los efectos tóxicos del plomo. El alelo ALAD2 se asocia a la producción de una proteína que une plomo con mucho mayor afinidad y que por lo tanto se la asocia a mayores niveles de plomo en sangre, incrementando el riesgo a los efectos tóxicos del metal (Kelada et al., 2001).

Excreción: es el proceso por el cual el tóxico es eliminado del organismo.

La eliminación de plomo absorbido, se produce mayormente por vía renal (aprox. 75%). El remanente que no es absorbido o que se excreta por vía biliar, se elimina principalmente en las heces (Hernberg, 2000) y en menor grado por pelos, uñas y secreciones.

El plomo es filtrado en el glomérulo renal y se demostró que existe reabsorción tubular del metal (Araki et al., 1986). La excreción urinaria de plomo, aumenta a plumbemias superiores a $25 \mu\text{g dl}^{-1}$, debido a la limitada capacidad de reabsorción tubular (Chamberlain, 1983).

1.9- Toxicocinética

La interacción de todos los procesos que integran el ADME, determina el tiempo de residencia del tóxico en el organismo. El estudio de la velocidad de cambio de

la concentración del tóxico dentro del organismo, es el objeto de estudio de la *toxicocinética*. Las velocidades de cambio de cada fase ADME se pueden modelar matemáticamente, de manera tal que representen la dinámica global del tóxico dentro del organismo. El conjunto de ecuaciones diferenciales integran un *modelo*, representan el cambio global de la concentración del tóxico, y esto se puede utilizar para predecir la magnitud de la respuesta tóxica en función de la exposición (Peña et al, 2001).

La *vida media*, es el tiempo que tarda el organismo en reducir a la mitad la concentración del tóxico.

La mayoría de los tóxicos siguen una cinética de primer orden. Suponiendo que se llega a un rápido equilibrio sangre-tejido, es válido suponer que existe un único compartimiento, entonces este modelo se podría representar de la siguiente manera:

$$dC/dt = - k_{el}C$$

C = concentración plasmática

k_{el} = constante de velocidad de eliminación de primer orden

t = tiempo al que se muestreó la sangre.

Se estima que la vida media del plomo que circula en el organismo es de uno a dos meses y que el depositado en huesos puede permanecer unos 30 años (Pincus, 1994). En estado de equilibrio, el 90 % del metal se encuentra en hueso, por lo que la plumbemia refleja una exposición reciente o recirculación, dependiendo si la medida se realiza inmediatamente a la exposición o habiendo cesado la misma (Rodríguez y Espinal, 2008). El plomo tiene afinidad por los sitios de acción molecular del Ca, por ejemplo actuando en eventos regulatorios intracelulares, ya que es capaz de actuar sobre las fosfodiesterasas dependientes de calmodulina, al inhibir a estas últimas, que son las mayores receptores intracelulares de calcio. Así también, el hueso constituye un órgano blanco, ya que el depósito de plomo en hueso está influido por prácticamente todos los procesos que afectan el depósito o la movilización del calcio en el mismo. El plomo reemplaza al Ca en la hidroxapatita, al formar complejos estables con el fosfato (Lloyd, 1975).

1.10- Niveles de plumbemia en nuestro medio

La OMS define la intoxicación por plomo cuando el valor del metal en sangre supera los 15 $\mu\text{g dl}^{-1}$. En niños, el límite que definió el CDC fue 10 $\mu\text{g dl}^{-1}$ (Rodríguez y Espinal, 2008).

En la intoxicación crónica pueden existir alteraciones biológicas en una etapa subclínica o de impregnación, donde no existen manifestaciones del saturnismo. Los niveles en sangre en esta etapa, pueden variar entre 35 y 60 $\mu\text{g dl}^{-1}$. En nuestro medio, los valores de referencia para la población no expuesta, de la ciudad de Buenos Aires, para un intervalo de confianza del 90%, se encontró que en los individuos de sexo femenino estudiados tuvieron valores de plumbemia comprendidos entre 1,99 y 15,18 $\mu\text{g dl}^{-1}$, mientras que el 90% de los varones se encontró entre los niveles de 3,06 y 17,67 $\mu\text{g dl}^{-1}$ (López et al., 2005) y en la ciudad de La Plata, al estudiar 208 individuos, se encontró que 90 % tuvo valores inferiores a 15 $\mu\text{g dl}^{-1}$ (De Cristóforo y Giannuzzi, 2002). En la Tabla 5, se presentan los niveles de plomo en sangre obtenidos en estudios locales y se los compara con diferentes estudios de EEUU, en los cuales se observa una disminución del orden de un 78% en un período de aproximadamente 20 años.

Los niveles de plomo en sangre son importantes para determinar el tipo de terapéutica a utilizar. Se ha informado que puede existir sintomatología debido a la intoxicación plúmbica incluso a bajos niveles de exposición como es el caso de déficit intelectual en niños (Needleman y Gatsonis, 1990). También se encontró que los niños de menor edad tienen mayor riesgo de anemia a niveles más bajos de plomo que los niños de mayor edad (Schwartz, 1990).

Tabla 5. Niveles de plumbemia en EEUU y en nuestro país

Autor	Valor reportado	Valor ($\mu\text{g dl}^{-1}$)
NHANES, 1976	Media poblacional-EEUU	12,8
U.S.EPA, 1977	Rango normal-EEUU	15-25
NHANES, 1993	Media poblacional-EEUU	2,8
De Cristóforo Y Giannuzzi, 2002	Rango 90% La Plata Argentina	<15
López et al., 2005	Rango 90% Cap. Fed. Argentina	2,0-15,2 (Fem.) 3,1-17,7 (Masc.)

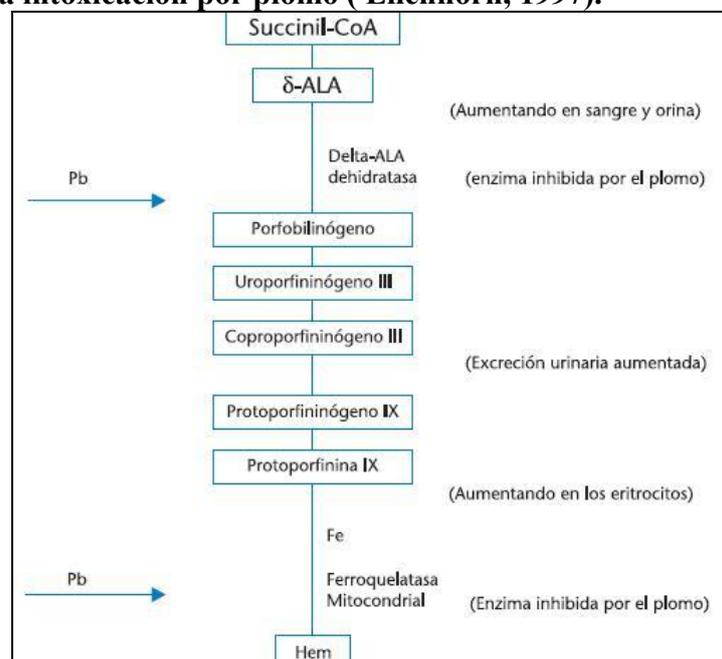
1.11- Bioquímica

El plomo ejerce su acción tóxica al combinarse con los grupos sulfhidrilo de la cisteína con alta afinidad, con otros grupos como el amino de la lisina o el carboxilo del ácido glutámico o aspártico, y el hidroxilo de la tirosina. Esto produce la modificación de la estructura terciaria de las proteínas y la inhibición, por lo tanto, de la actividad enzimática. De este modo, el metal afecta diversas vías enzimáticas y procesos fisiológicos, siendo especialmente sensibles al plomo, los metabolismos mitocondriales (Piomelli, 2003). Así las enzimas que son ricas en grupos sulfhidrilos, son más sensibles a la inhibición a pequeñas concentraciones de plomo.

Estudios realizados con isótopos radioactivos de plomo, ^{210}Pb y ^{203}Pb , mostraron la acumulación del metal en la mitocondria (Castellino y Aloj, 1969; Barlop et al., 1974).

Una de los más importantes efectos del plomo, es la inhibición de la síntesis del grupo hemo en los eritroblastos de médula ósea (Figura 4), al actuar sobre las dos enzimas más importantes de la vía biosintética: la ácido deltaminolevulinico-deshidratasa (ALAD) citosólica, que convierte el ácido delta-aminolevulinico (δ -ALA) en porfobilinógeno, y la ferroquelatasa de la matriz mitocondrial, que cataliza la inserción del hierro desde la ferritina, hacia el anillo de la protoporfirina para formar el grupo hemo (Piomelli, 1987 y 2003). Ambas enzimas tienen grupos sulfhidrilos que las hacen sensibles al metal.

Figura 4. Vía biosintética del grupo Hemo, indicando la localización de las enzimas que son afectadas en la intoxicación por plomo (Ellenhorn, 1997).



El efecto de la inhibición de la ALAD resulta en la acumulación de su sustrato, δ -ALA, que aumenta en plasma y se excreta en orina. El exceso del δ -ALA, tiene

efectos tóxicos sistémicos (Litman y Correia, 1983). El zinc cumple un rol importante en la actividad de esta enzima y puede desplazar, a altas concentraciones, al plomo, al competir por los mismos sitios de unión (Abdulla y Haeger-Aronsen, 1971).

El efecto más notable de la inhibición de la ferroquelatasa es la acumulación de la protoporfirina eritrocitaria. Se demostró *in vitro* que compuestos con grupos sulfhidrilos protegen su actividad enzimática. (Sassa, 1973). *In vivo*, ocurren dos fenómenos de importancia: la inhibición enzimática y la interferencia del plomo, en el transporte mitocondrial de hierro, ya que es un proceso que requiere energía y es inhibido por el primer metal (Flatmark y Romslo, 1975). Así, el nivel de concentración de plomo en la médula ósea puede inferirse por la medida de la protoporfirina que se acumula en los hematíes (Piomelli, 1973). El término protoporfirina libre eritrocitaria (PEL) hace referencia a la falta de hierro en el centro del anillo tetrapirrólico. La protoporfirina encontrada en los pacientes anémicos y en los intoxicados con plomo, es quelada con zinc y se denomina zinc protoporfirina (ZPP) (Lamola et al., 1975).

1.11.1- Biomarcadores

Como se mencionó anteriormente, existen dos tipos de biomarcadores o indicadores que dan información sobre la absorción de plomo en el organismo: los de exposición y los de efecto. Los primeros muestran el grado de exposición, los segundos detectan alteraciones que se verifican en el órgano blanco, luego de la absorción (Padilla Magunazelaia et al., 1999).

Los biomarcadores de exposición son la plumbemia (Pb-S) y la plumburia (Pb-U). Los biomarcadores de efecto más utilizados son la actividad de la enzima ácido delta aminolevulínico deshidratasa en sangre (ALAD) y en orina (ALAD-U), el ácido delta-aminolevulínico urinario (ALA-U) y las protoporfirinas eritrocitarias, ZPP y PEL.

Los biomarcadores habitualmente utilizados en la determinación del perfil plúmbico, son Pb-S y ALAD. Otros parámetros utilizados con el mismo fin son la excreción urinaria de plomo (Pb-U), la concentración urinaria de ALA-U y la medida de la concentración de protoporfirinas en sangre, ZPP y PEL y coproporfirinas en orina.

Las metalotioneínas (MT) son proteínas citosólicas que se producen en respuesta específica a la exposición por metales (Porta, 2001) tendrían un rol protector,

podrían ser utilizadas como biomarcador de exposición al plomo aunque esto ha sido discutido (Lee et al, 1983).

Ninguno de los biomarcadores mencionados aquí puede ser realizado en un laboratorio de análisis clínicos mediano o pequeño de nuestro medio, ya que para el desarrollo de estas técnicas, es necesario contar con instrumental o reactivos onerosos.

1.11.2- Plombemia y ALAD

Como se mencionó anteriormente, el plomo puede inhibir algunas enzimas de la vía biosintética del grupo prostético Hemo, como por ejemplo, la ALAD, que convierte ALA a porfobilinógeno. Esta es una de las enzimas más susceptibles a la exposición por plomo debido a sus grupos sulfhidrilos (Piomelli, 2003)

La inhibición de la actividad enzimática de la ALAD por plomo, puede evaluarse como uno de los más sensibles indicadores de la exposición por plomo (Porru y Alessio, 1996). La inhibición enzimática de ALAD puede seguirse por la excesiva producción de ALA que finalmente conduce al aumento en la excreción de ALA-U (Alessio, 1988).

1.11.3- Estudios en orina

Otros estudios que actualmente están disponibles son la determinación de parámetros relacionados a la síntesis del hemo, plomo total en orina (Pb-T), plomo inorgánico en orina (PbI) y plomo orgánico urinario (Pb-O).

Vural y Duydu, (1995), midieron por espectrofotometría de absorción atómica por llama, en trabajadores de estaciones de servicio expuestos al tetraetilplomo, una excreción urinaria de plomo total de $111.9 \mu\text{g l}^{-1}$ y plomo inorgánico de $50.2 \mu\text{g l}^{-1}$. La diferencia entre esos valores puede ser por la presencia en la orina de plomo orgánico. Los valores de $110 \mu\text{g l}^{-1}$ son considerados seguros según Fleming (1964), entonces el valor medio es aceptable, pero de acuerdo con Kehoe (1983), los valores mayores de $150 \mu\text{g l}^{-1}$ son un fuerte indicador de la absorción de plomo. Con este criterio los trabajadores estudiados estarían en un grupo de riesgo. Vural y Duydu (1995), encontraron que 5 trabajadores superaban este límite y lo fundamentaron por que éstos tenían el hábito de utilizar la nafta para la limpieza, en especial de manos. Los trabajadores, no tuvieron desordenes clínicos apreciables, sin embargo, los altos niveles de Pb encontrados en orina pudo haberles ocasionado problemas a largo plazo.

En otro trabajo realizado por los mismos autores en 1998, mencionan que el peligro se debe a la excelente penetración por piel del TEP por su alta solubilidad en este tejido, hecho también mencionado por Grandjean y Nielsen (1979). Los trabajadores estuvieron expuestos al TEP principalmente por inhalación, pero los empleados mecánicos tuvieron una vía adicional de exposición por la piel, ya que presentaban el hábito de limpiar sus manos con nafta.

Los niveles de Pb utilizados en la nafta común son de 0,5 gr. de Pb l⁻¹ y en la súper de 0,4 gr l⁻¹.

Muchos investigadores mostraron que el plomo es excretado en orina bajo la forma de Et₃Pb⁺¹, Et₂Pb⁺² y Pb, siendo el Et₂Pb⁺² considerado como indicador específico a la exposición por TEP (Turlakiewicz y Chmielnicka, 1985). Vural y Duydu (1988), mencionan que las naftas sin plomo se utilizan en países desarrollados mientras que en países en vías de desarrollo, la concentración de plomo en el aire ambiental es más alta en zonas de tránsito intenso (Caplun et al, 1984; Shy, 1990).

1.11.4- Protoporfirinas

La concentración de Protoporfirina Eritrocitaria Libre (PEL) en sangre aumenta exponencialmente en la intoxicación por plomo (Piomelli, 2003).

El método fluorométrico para la medida de PEL, tiene la ventaja de indicar directamente efectos metabólicos debidos a la absorción del plomo, correlacionando claramente con las concentraciones de plomo y no es afectado por la contaminación ambiental como lo es la medida de plomo en sangre. El test es positivo, cuando la concentración de PEL >160µg dl⁻¹ de GR (>60µg dl⁻¹ de sangre entera). A todos los individuos que tienen el test de PEL positivo, debe medirse la concentración de plomo en sangre.

La anemia por déficit de hierro puede provocar un pequeño a moderado aumento de PEL de hasta 500µg dl⁻¹ de GR (190µg dl⁻¹ de sangre entera). Valores por encima de estos son observados exclusivamente en la intoxicación por plomo y en raros desordenes genéticos como la porfiria eritropoyética. A los individuos con valores moderadamente aumentados debe realizarse el diagnóstico diferencial de anemia por déficit de hierro e intoxicación por plomo por la medida del metal en sangre (Piomelli, 198).

1.11.5- Ferremias

Se ha demostrado que existe una relación entre la deficiencia de hierro medida en función de los índices hematimétricos y el aumento de la concentración de plomo en sangre (Wright et al. 1999).

Según la Asociación Americana de Pediatría, se considera ferropenia cuando:

VCM < 70 fl y ADE > 14.5% en menores de 2 años

VCM < 73 fl y ADE > 14.5% en mayores o iguales a 2 años

Según el CDC, se establece como límite de intoxicación con plomo el nivel de 10 $\mu\text{g dl}^{-1}$ del metal en sangre, en niños.

Los datos sugieren que la deficiencia de hierro predispone a la intoxicación por plomo. Se han reportado estudios en animales, que muestran una mayor absorción del plomo ingerido en animales deficientes en hierro, respecto a aquellos que tienen los depósitos normales (Six y Goyer, 1972; Barton et al, 1978).

El Pb es un metal de interés toxicológico-laboral. Su acción tóxica tiene como uno de los blancos a los precursores eritroides. Como consecuencia de ello se esperaría un trastorno en el metabolismo del hierro (Ventimiglia et al., 2007), en los individuos expuestos laboralmente al plomo y en aquellos que tienen una susceptibilidad mayor a la intoxicación, los niños (Wright et al., 2003).

Barton et al (1978) sugirió que los efectos de la deficiencia de hierro en la absorción de plomo podrían ser mediados por un receptor absorbivo común. Si esto fuera así, no sólo la deficiencia de hierro predispone a la intoxicación por plomo, sino que también la intoxicación por plomo predispone del mismo modo a la deficiencia de hierro. Se hallaron evidencias de esto al descubrirse la proteína que realiza el transporte a través de la membrana intestinal. En la intoxicación por plomo, existe una dificultad en la absorción intestinal de hierro, debido a que la misma se realiza mediante un transportador de cationes divalentes (DMT1) que no es específico para el hierro, sino que también transporta otros cationes como el plomo (Fleming, 2005), y que en el caso del saturnismo, genera una competencia por dicho transportador (Vivante et al, 2008), con el consiguiente déficit absorbivo del primero (Ventimiglia et al., 2006) y también predispone a la intoxicación por plomo en dietas pobres en Fe (Bressler et al, 2004).

El plomo por un lado interfiere en el metabolismo de síntesis del grupo Hemo, por inhibición de enzimas de la vía, por lo que se produce una acumulación de hierro no utilizado dentro de los eritroblastos. Por otro lado, existe una relación entre la absorción de plomo y la de hierro. Esto fue demostrado en trabajos de asociación entre la deficiencia de hierro y el aumento en la absorción de plomo (Osatinsky, 2004) y en experiencias cortas de exposición al plomo donde se

midió un descenso en la ferremia y la concentración de ferritina sérica (Vivante et al., 2008).

El hierro se encuentra en el organismo en pools o compartimientos: de reserva (en la ferritina, hemosiderina en eritroblastos de MO y macrófagos del SRE), de transporte (en transferrina) y de utilización (en eritroblastos) (Vives Corrons, 2001).

El plomo produce un aumento en la concentración de PEL, por inhibición de la ferroquelatasa. La enzima es un punto de regulación de la biosíntesis del Hemo y su inhibición produce también, la acumulación de hierro intramitocondrial por déficit en su utilización. La inhibición de la ferroquelatasa puede decrecer la eficiencia con la que el hierro es descargado de la transferrina (Ponka, 1997) al disminuir la síntesis y expresión del número de receptores en la superficie de los eritroblastos. También se reportó la disminución en el transporte de hierro a la mitocondria por inhibición de las enzimas responsables de la producción de energía (Flatmark y Romslo, 1975). El aumento de hierro circulante produce un efecto negativo sobre la absorción intestinal de hierro y sobre la síntesis de transferrina (Fleming, 2005), es un indicador de la falta de utilización biológica y puede medirse en individuos expuestos en forma crónica (Ventimiglia et al., 2007).

1.12- Modelos

Los modelos compartamentales son capaces de predecir el contenido de plomo en el organismo, debido a la presencia del metal en las diferentes fuentes como en la ingesta dietaria, la exposición ocupacional, y la debida a la exposición ambiental. Han demostrado ser de gran utilidad en los estudios retrospectivos y en estudios de evaluación de riesgo. Los modelos desarrollados permiten predecir la carga de plomo en el organismo, generalmente están basados en consideraciones toxicocinéticas y son validados por resultados obtenidos experimentalmente, a partir de la medición de los niveles del metal en el organismo (Ventimiglia et al., 2009).

A continuación se describen los diferentes modelos que han sido propuestos:

1.12.1- Modelos farmacocinéticos basados en la Fisiología (PBPK)/ Modelos farmacodinámicos (PD)

Los modelos PBPK/PD establecen relaciones entre procesos biológicos críticos, para la incorporación y disposición de sustancias químicas, mediante el uso de desarrollos matemáticos que los describen cuantitativamente (Krishnan et al, 1994); de este modo, utilizan descripciones matemáticas de funciones dosis-respuesta, para cuantificar la relación entre la dosis en el tejido blanco y las concentraciones finales (*end points*).

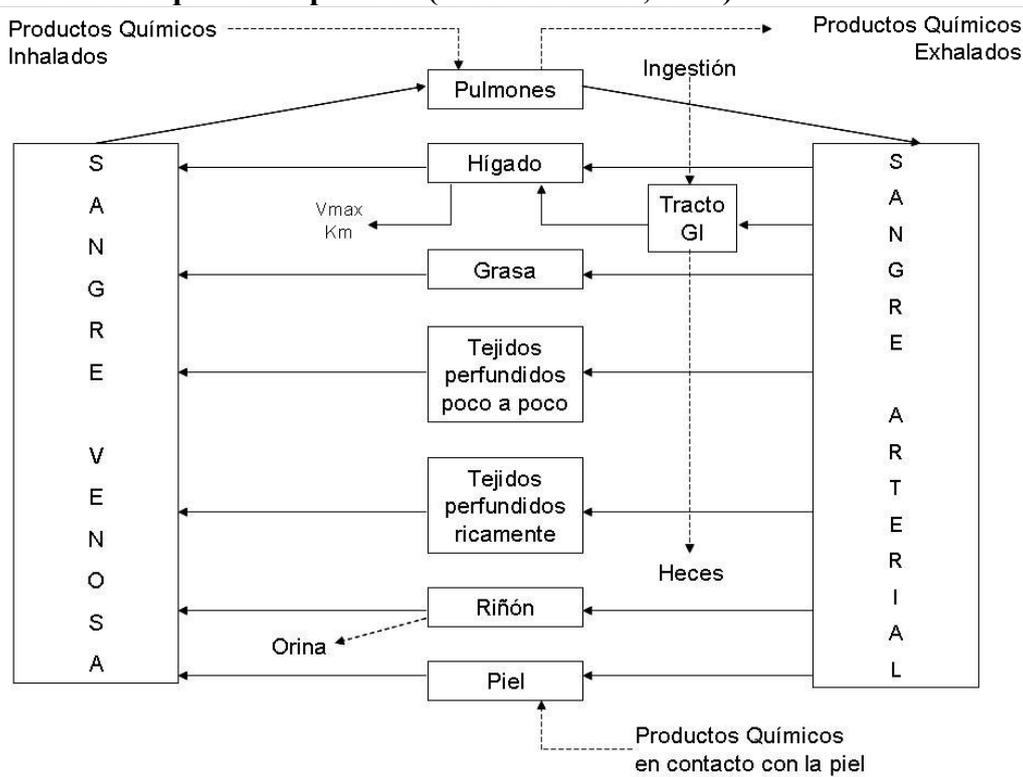
Este tipo de modelos están siendo cada vez más utilizados en evaluaciones de riesgo, para extrapolar la conducta farmacocinética de los potenciales tóxicos basándose en consideraciones biológicas y mecanísticas, predecir la concentración de una sustancia química sobre el órgano blanco, el seguimiento de las rutas alternativas, diferentes niveles de dosis y en comparaciones entre especies y sub-especies (Clewel y Andersen, 1985).

Los modelos PBPK/PD para una sustancia química son desarrollados en cuatro etapas: la representación del modelo, la parametrización, la simulación y la validación del mismo (Andersen y Krishnan, 1994).

Las expresiones matemáticas utilizadas en los modelos PBPK/PD simplifican grandemente la complejidad de los sistemas biológicos, sin embargo esta es una característica buscada, debido a que la mayoría de las veces no se cuenta con la información de muchos de los procesos biológicos. Es un beneficio contar con un modelo simplificado, ya que se reduce la magnitud de la incertidumbre acumulada. La adecuación del modelo es entonces de gran importancia y la validación del mismo es esencial para el uso de los modelos PBPK en las evaluaciones de riesgo, donde superan a las extrapolaciones farmacocinéticas en la identificación del máximo nivel para la exposición de los humanos a las sustancias químicas (Andersen y Krishnan, 1994).

En la Figura 5, se muestra que la absorción del tóxico puede realizarse vía inhalatoria, por ingestión o por la vía dérmica, luego es metabolizado en el hígado y excretado en orina o por exhalación (Krishnan et al., 1994).

Figura 5. Representación del Modelo Farmacocinético basado en la Fisiología (PBPK/PD) para una sustancia química hipotética (Krishnan et al., 1994).



Los primeros modelos fueron realizados en base a postulados de la farmacocinética. Los compartimientos, representaron órganos individuales o grupos de órganos que compartían características comunes, y fueron definidos como *pools* que eran cinéticamente homogéneos. El cuerpo, se representaba como un compartimiento central (por ejemplo, plasma sanguíneo), y estaba en relación a uno o dos compartimientos periféricos que podían tener diferentes velocidades de intercambio, relativamente rápida o lenta, con el primero (O'Flaherty, 1987).

Uno de los primeros modelos fue el propuesto por Rabinowitz et al. (1976), basado en el estudio de la cinética de trazadores isotópicos estables de plomo, ingeridos por cinco individuos sanos de sexo masculino. En dicho modelo, el metal se distribuye en tres compartimientos: un compartimiento central que representa a la sangre, otros tejidos y espacios en rápido equilibrio con la sangre (por ejemplo el líquido intersticial); un compartimiento poco profundo, que representa a tejidos blandos y *pools* de plomo que tienen un intercambio rápido dentro del esqueleto; y por último, un compartimiento profundo que representa al *pool* de plomo de intercambio lento entre la sangre y el hueso.

Las vías de excreción son representadas en el modelo incluyendo la urinaria, desde el compartimiento central y la bilis, el sudor, el pelo y uñas, provenientes del compartimiento poco profundo.

Estos modelos permitían calcular las velocidades de intercambio y el tiempo de residencia del plomo en los diferentes *pooles* del organismo (Rabinowitz, 1998). El tiempo de residencia, se define como la inversa de la suma de las constantes de velocidad individual de eliminación. Este modelo, predice mediante ecuaciones de primer orden, que el tiempo medio para el plomo es aproximadamente 25, 28 y 10^4 días en los compartimientos central, tejidos superficiales blandos y profundos, respectivamente. La cinética lenta de los compartimientos del tejido profundo conduce a la predicción de que podría contener la mayor concentración de plomo después de largas exposiciones (años), como se demostró en muestras realizadas en autopsias de humanos.

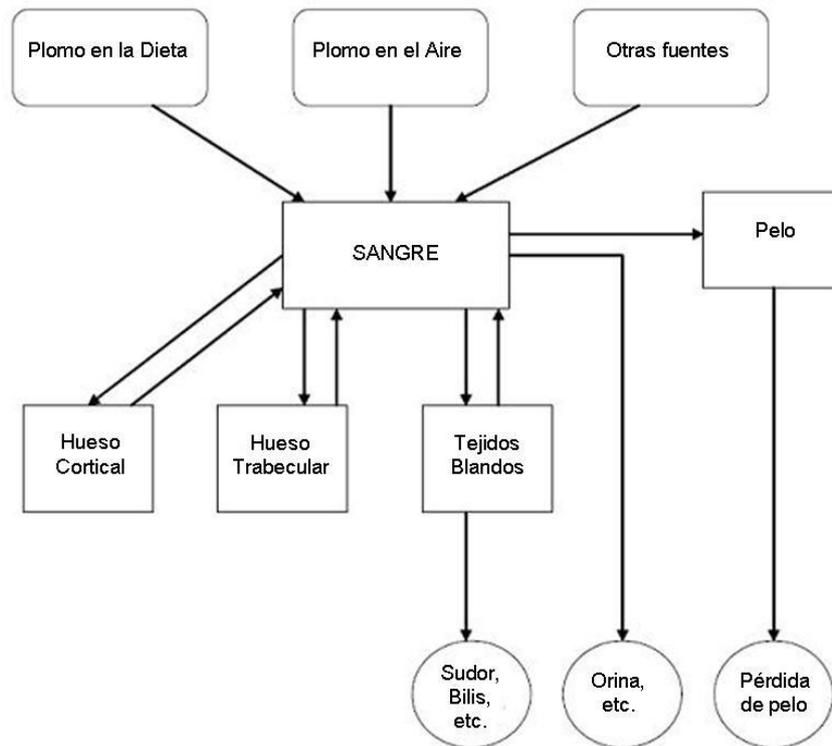
El modelo de Rabinowitz et al., no tiene en cuenta la distribución de plomo que ocurre dentro del compartimiento sanguíneo, entre los eritrocitos y el plasma, así como tampoco los procesos fisiológicos de remodelamiento óseo que pueden alterar la cinética del compartimiento de los tejidos profundos.

Se retomará este modelo de Rabinowitz et al. (1976), en el capítulo de Discusión y conclusiones.

Marcus (1985) analizó los datos obtenidos a partir de los estudios utilizando trazadores isotópicos estables de plomo realizados por Rabinowitz et al. (1976) y ello lo condujo a formular un modelo cinético multicompartimental que incluía la separación en *pooles* con diferentes compartimientos, para el hueso trabecular (rápido, $t_{1/2}$: 100-700 días) y cortical (lento, $t_{1/2}$: $1,2 \times 10^4$ - $3,5 \times 10^4$ días) (Figura 6).

Este enfoque fue adoptado en una serie de modelos posteriores como el de Bert et al (1989); U.S.EPA (1994); Leggett (1993) y O'Flaherty (1993).

Figura 6. Compartimientos y vías de intercambio de plomo en el modelo de Marcus (1985). Cinética del plomo en el cual el hueso es representado en dos compartimientos diferenciados.



Una representación más compleja del modelo de la distribución del plomo en el hueso, incluyendo una simulación de la difusión del metal dentro del volumen del ostión y el intercambio a nivel de los canalículos se ilustra en la Figura 7. El modelo de difusión basado en la cinética del plomo se fundamenta en estudios realizados en perros. Marcus (1985) introduce una cinética no lineal de intercambio de plomo entre los eritrocitos y el plasma. El modelo sanguíneo incluye cuatro subcompartimientos: plomo difusible en plasma, proteínas que unen plomo en plasma, un grupo poco profundo de eritrocitos y un grupo profundo de eritrocitos (ver Figura 8).

Figura 7. Modelo esquemático de la cinética del plomo en hueso, en donde el mismo es representado como un extenso terreno canalicular cilíndrico. El territorio canalicular tiene radio b y los canalículos están en los alrededores del radio a . El plomo difunde a

través del radio r , entre el fluido en los canalículos que se comunican con la sangre en el canal Haversiano y el volumen del hueso. (Marcus, 1985).

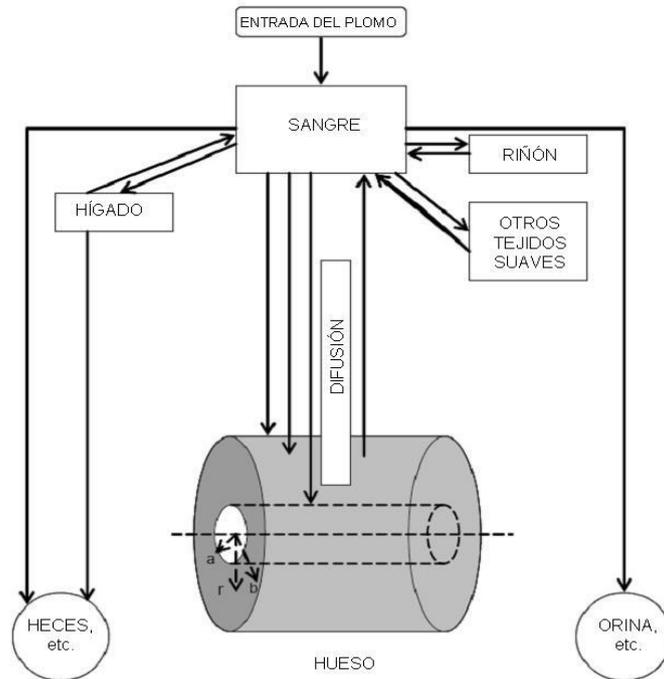
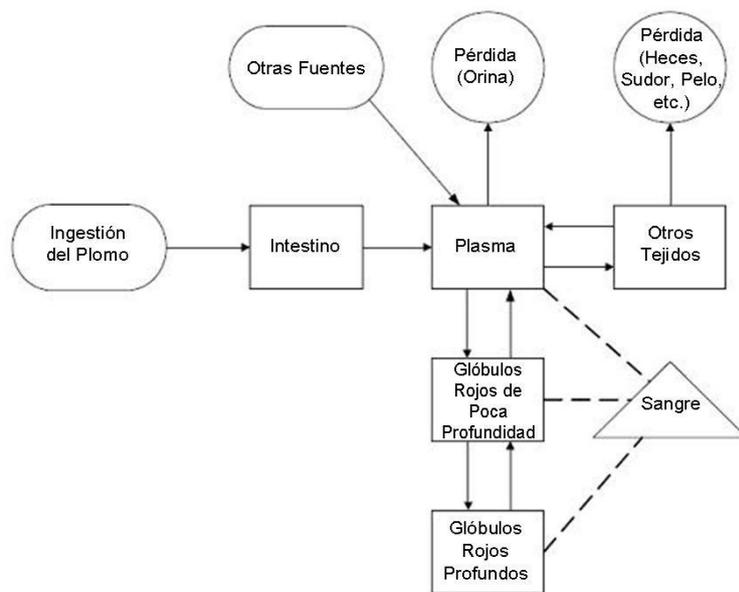


Figura 8. Esquema del modelo compartamental para el plomo en el plasma y en hemáties de acuerdo a Marcus (1985). Aquí el plasma es representado como el compartimiento de intercambio central y las células rojas tienen dos compartimientos, uno superficial y otro profundo.



Bert desarrolló en 1989, un modelo compartimental en un individuo de sexo masculino y de 70 kg de peso, para el ingreso, absorción, distribución, transporte y excreción de plomo, basado en consideraciones farmacocinéticas y en resultados experimentales. Para predecir los niveles de plomo en los diferentes compartimientos (hueso, sangre y otros tejidos), se utilizó un juego de ecuaciones de primer orden, donde la concentración del metal depende del tiempo de ingreso a partir de que es absorbido desde el aire o es ingerido. Dicho autor, encontró una excelente concordancia con los resultados de Rabinowitz et al. (1976) en las medidas de plomo.

Comparando el modelo propuesto por Bert con el establecido por Bernard (1977), las concentraciones de plomo para períodos cortos de tiempo (en orden de magnitud de meses) fueron predichos mejor por el primer modelo, mientras que ambos predijeron en forma similar el comportamiento a largo plazo (5 años o más). Bert modificó y expandió modelos existentes y determinó una serie de coeficientes (constantes) de velocidad de transporte que al utilizarlas, le permitió predecir razonablemente bien, cuanti y cualitativamente, los resultados experimentales.

Los modelos que aparecieron con posterioridad, poseen expansiones, detalles y refinamientos de los hasta aquí mencionados, y sembraron las bases biocinéticas, sobre el conocimiento del metabolismo del plomo en el tejido óseo y sobre la exposición al metal.

Actualmente, tres modelos farmacocinéticos son los más utilizados, por ser considerados de amplia aplicación en estudios sobre la evaluación de riesgo de la intoxicación por plomo: el modelo de O'Flaherty que simula la cinética de plomo desde el nacimiento hasta la adultez (O'Flaherty, 1993); el modelo biocinético de

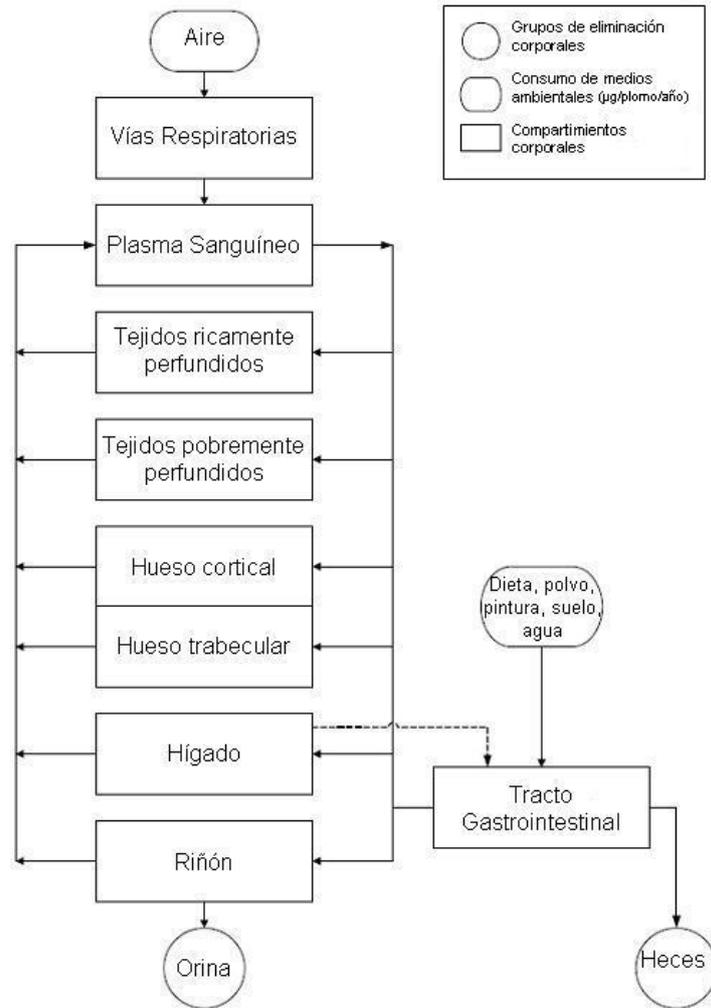
exposición integral al plomo (IEUBK) para el plomo, desarrollado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA,1994) en niños; y el modelo de Leggett que simula la cinética del nacimiento hasta la adultez (Leggett, 1993).

De los tres modelos, el de O'Flaherty tiene un menor desarrollo en cuanto a parámetros plomo-específicos y hace uso, con mayor seguridad, de parámetros basados en la fisiología para describir los volúmenes, flujos, composiciones y actividad metabólica de la sangre y el hueso en la determinación de la distribución del plomo en el cuerpo humano. Los modelos IEUBK y el de Leggett, son clásicos multicompartamentales. Los valores de las constantes de velocidad de transferencia de plomo edad específica, están basados en datos obtenidos a partir de estudios sobre la cinética del metal en animales y en humanos, y pueden no tener una correlación fisiológica precisa (ATSDR, 2007).

1.12.2- El modelo de O'Flaherty

El modelo de O'Flaherty, simula la exposición, incorporación y eliminación del al plomo en humanos, teniendo en cuenta las diferentes etapas de la vida (O'Flaherty, 1993). La Figura 9, muestra una representación esquemática que incluye el movimiento de distribución del plomo desde las vías de exposición (por ejemplo, vía inhalatoria o ingestión) hacia los pulmones y el tracto gastrointestinal, siguiendo por los consecuentes cambios entre el plasma sanguíneo, hígado, riñón, tejidos rica y pobremente perfundidos, compartimientos de hueso y excreción por vía hepática y/o renal. El modelo simula el cambio de los tejidos con la edad, incluyendo el crecimiento y resorción ósea (ATSDR, 2007).

Figura 9. Esquema del modelo cinético de la distribución de plomo según O'Flaherty (1993), donde se detallan los compartimientos y las vías de intercambio de plomo.



Tiene en cuenta tanto la absorción dependiente de la edad, como así también de la vía de absorción. Una parte primordial del modelo, es el diseño de una curva de crecimiento, basada en una expresión que relaciona el peso con la edad. La ecuación que vincula estas variables, posee 5 parámetros constantes, con lo que puede ser fácilmente adaptable a todo el rango de las curvas de crecimiento estandarizadas para varones y mujeres. Como muchas de las funciones farmacocinéticas son basadas en el peso corporal y en la edad, el modelo puede ser utilizado para estimar las concentraciones a lo largo de un extenso rango de edades, incluyendo infantes, niños, adolescentes y adultos.

El modelo usa parámetros de base fisiológica para describir el volumen, composición y actividad metabólica de la sangre, tejidos blandos y hueso para determinar la distribución de plomo en el cuerpo humano.

El intercambio de plomo entre el plasma sanguíneo y hueso es simulado como un proceso paralelo que ocurre en hueso cortical (80% del hueso) y trabecular (20%

del hueso). La incorporación y la eliminación de plomo del hueso trabecular y del cortical metabólicamente activo, son funciones de la velocidad de formación y resorción, respectivamente, simuladas por funciones dependientes de la edad, que conducen a una cinética en el hueso. De este modo, se representa que el hueso inmaduro posee la tasa de recambio (formación y resorción) más alta que en el hueso maduro donde esta remodelación tiene una velocidad más lenta. Sin embargo, los cambios en las velocidades de recambio del mineral óseo debido a la senescencia (por ej. las que ocurren en la menopausia) no son representados en el modelo. En las regiones del hueso donde se da un activo recambio del mineral óseo, una región de baja cinética en el hueso maduro cortical, también es representado y es aquí donde ocurre un intercambio heteroiónico con otros minerales, como el calcio, hacia la sangre. El mismo es simulado por la difusión radial en el volumen del hueso del ostión. Los procesos están relacionados al peso corporal y a la diferencias de velocidades de intercambio que ocurren con la edad. Esta aproximación permite incluir en la simulación, los efectos de la formación ósea (por ej. crecimiento) y pérdidas, cambios en el volumen y en la maduración del hueso sobre la incorporación y liberación de plomo por parte de este tejido.

Los intercambios entre la sangre y los tejidos blandos (riñón, hígado) son representados como procesos de flujo limitados. Así, el modelo simula proteínas que unen plomo en los eritrocitos con una cinética de saturación. Esto explica las relaciones entre plasma y eritrocitos, observadas en humanos. Las rutas de excreción incluyen al riñón para la orina y al hígado para la bilis. La excreción total es simulada como función de la tasa de filtración glomerular. Las velocidades de excreción biliar y urinaria son proporcionales al 70 y 30 % del aclaramiento total del plasma respectivamente.

El modelo de O'Flaherty, simula la absorción de plomo por vía inhalatoria y por ingestión. La velocidad de inhalación es dependiente de la edad. La absorción del plomo por vía inhalatoria es simulada como una fracción (0,5) del plomo total inhalado y es independiente de la edad. El modelo simula la exposición por ingestión desde la infancia, a partir de tierra, polvo y en el agua de bebida. La velocidad de la ingestión es dependiente de la edad, incrementándose aproximadamente 130 mg día^{-1} hasta los 2 años y declinando hasta $< 1 \text{ mg día}^{-1}$ hasta los 10 años. La absorción gastrointestinal de plomo en la dieta y en el agua de bebida, es simulada por una fracción que declina desde 0,58 al momento del nacimiento hasta 0,08 después de los 8 años. Estos valores pueden factorizarse a cuenta de la biodisponibilidad relativa cuando son aplicados en la absorción de plomo ingerido en polvo o en la tierra.

El modelo de O'Flaherty tiene variadas aplicaciones, como por ejemplo, en la evaluación de riesgo potencial en sitios de desechos peligrosos. Puede ser usado

para predecir las concentraciones de plomo en sangre para un amplio rango etario que incluye infantes, niños y adultos. También puede modificarse para simular los aspectos farmacocinéticas del plomo en subpoblaciones incluyendo a la mujer embarazada y el feto, así también como a las personas ancianas. El modelo no contiene un módulo de exposición detallado, sin embargo las simulaciones del modelo han sido ajustadas a variables fisiológicas que permiten variar las concentraciones de plomo en el suelo y el polvo, de manera tal de estimar el rango de concentraciones de plomo ambiental que debería esperarse, para tener una correspondencia entre las concentraciones sanguíneas del metal estimadas y observadas. (O'Flaherty, 1993 y 1995).

El mencionado modelo, utiliza puntos estimados para valores de parámetros y puntos de devolución estimados como salidas. Los sucesivos desarrollos del modelo introdujeron la aproximación Monte Carlo para simular la variabilidad en la exposición, absorción y la capacidad de unión a eritrocitos (Beck et al, 2001). Esta extensión del modelo puede ser utilizada para predecir la probabilidad de que niños expuestos al plomo ambiental tengan niveles del metal en sangre que puedan exceder los niveles recomendados (por ej. $10 \mu\text{g dl}^{-1}$).

El modelo fue diseñado para operar con un tiempo de exposición de un año (mínimo intervalo de tiempo). Sin embargo, los códigos de implementación permiten la construcción de la simulación con tiempos de exposición tan chicos como 1 día, lo cual permite que la simulación cambie rápidamente frente a exposiciones intermitentes (por ej, frente a un evento de exposición aguda).

Se llevaron a cabo varios estudios de validación del modelo. El modelo fue inicialmente calibrado para predecir las concentraciones de plomo en sangre, hueso y tejidos en ratas (O'Flaherty, 1991) y fue modificado para reflejar las características fisiológicas en niños (O'Flaherty, 1993), adultos (O'Flaherty, 1995) y monos *Cynomolgus* (O'Flaherty et al, 1998). Los parámetros del modelo fueron modificados para corresponder con la información disponible sobre la anatomía y fisiología de las especies y a la edad específica. En general, el modelo ha mostrado una buena reproducción de los niveles de plomo en sangre en las observaciones realizadas en niños y en adultos, excepto en instancias donde el plomo es ingerido a muy altas concentraciones. (O'Flaherty, 1993, 1995).

1.12.3- El modelo Biocinético de exposición integral al plomo (IEUBK)

El modelo IEUBK para niños, es un ejemplo clásico de modelo farmacocinético multicompartimental, unido a un modelo probabilístico y de exposición de la distribución de plomo en sangre en poblaciones de niños de 0 a 7 años (US.EPA 1994; White et al. 1998). El modelo fue desarrollado para predecir la probabilidad de concentraciones elevadas de plomo en sangre en niños. El

modelo IEUBK opera con tiempos de exposición de 1 año, (tiempo mínimo para un evento de exposición único), sin embargo, es más apropiado para aplicaciones de mayor promedio de exposición. La Figura 10 muestra una representación de modelo IEUBK. El mismo tiene cuatro submodelos mayores:

- A. *Submodelo de exposición*: simula la incorporación de plomo en promedios por día a través del aire ($\mu\text{g m}^{-3}$), dieta ($\mu\text{g día}^{-1}$), polvo derivado de la tierra ($\mu\text{g g}^{-1}$) y en el agua ($\mu\text{g L}^{-1}$). El modelo permite el ingreso de las velocidades de incorporación de plomo al organismo (por ej. velocidades de volumen de aire respirado, velocidad de consumo de agua, etc.). En la vía de exposición aérea, se divide en el aire dentro y fuera de la casa, con valores dependientes de la edad para el tiempo (horas día⁻¹). Así también para el polvo derivado de la tierra, se realizan las mismas consideraciones. Los ingresos por todas las vías de exposición (dieta, agua, polvo derivado de la tierra) se suman para calcular el ingreso total al tracto gastrointestinal, con el objeto de estimar la capacidad de absorción.
- B. *Submodelo de absorción*: simula la absorción del metal por el tracto gastrointestinal como la suma de procesos de capacidad limitada (por una relación del tipo similar a la ecuación de Michaelis-Menten) y de capacidad ilimitados (representados por una relación lineal de primer orden). Estos dos términos están destinados a representar dos mecanismos diferentes de absorción de plomo, una aproximación que está de acuerdo con los datos disponibles en humanos y animales que sugieren una capacidad limitada en su absorción. Uno de los parámetros para el proceso de absorción de capacidad limitada (representado por la velocidad máxima de absorción), es dependiente de la edad. La representación de la figura 10 muestra la absorción fraccional del plomo ingerido como función del plomo total ingerido. La fracción de absorción es también específica del medio. A los 30 meses de vida, las bajas ingestas ($< 200 \mu\text{g día}^{-1}$), tienen un importante significado sobre la absorción. Así, la fracción de plomo ingerido en los alimentos o en el agua de bebida es 0,5 y disminuye aproximadamente 0,11 (con una ingesta $> 5000 \mu\text{g día}^{-1}$). Para el plomo ingerido en polvo o tierra, la fracción absorbida es 0,35 a bajas ingestas ($< 200 \mu\text{g día}^{-1}$) y disminuye hacia 0,09 (ingesta $> 5000 \mu\text{g día}^{-1}$). El modelo asume que el 32% del plomo inhalado es absorbido. Este valor fue originalmente definido basándose en un escenario de exposición a emisiones de fundiciones de plomo activas, en los cuales se asumió que la distribución del tamaño de las partículas en la vecindad de dichas fábricas es la siguiente ($< 1 \mu\text{m}$, 12,5%; $1-2,5 \mu\text{m}$, 12,5%; $2-15 \mu\text{m}$, 20%; $15-30 \mu\text{m}$, 40%; $> 30 \mu\text{m}$, 15%). Esto es relevante ya que se observó que los depósitos de las fracciones son tamaño-específicas para las regiones nasofaríngea, traqueobronquial y alveolar. La absorción del plomo depositado en la

región alveolar se considera que es completamente absorbido, mientras que el depositado en las regiones restantes, se absorbe entre el 30 y 80 % de las partículas, que tienen un rango de tamaño entre 1-15 μm , asumiendo que son transportadas al tracto digestivo.

C. *Submodelo biocinético*, simula la transferencia del plomo absorbido entre la sangre (compartimiento central) y otros tejidos del cuerpo, la eliminación del plomo desde el organismo (por vía urinaria, en heces, piel, pelo y uñas) y predice el promedio de la concentración de plomo para un determinado tiempo de exposición o período. El modelo simula el crecimiento del cuerpo y de los tejidos, volumen de los compartimientos, y la masa y las concentraciones de plomo en cada compartimiento. La concentración de plomo en sangre al momento del nacimiento se estima en 0,85 de la concentración de la sangre materna. Las masas y concentraciones de plomo neonatales, son redistribuidas hacia otros compartimientos basados en la distribución del peso de las concentraciones de plomo en sangre neonatal. Los intercambios entre el compartimiento central y los compartimientos de los tejidos, son simulados como procesos que son parametrizados en forma unidireccional por constantes de primer orden. El hueso es simulado en dos compartimientos: un compartimiento relativamente rápido de hueso trabecular (representado el 20% del hueso) y uno relativamente lento de hueso cortical (representando el 80% del volumen). El ingreso de plomo en los eritrocitos, es simulado con una función saturable a la máxima concentración del plomo eritrocitario ($120 \mu\text{g l}^{-1}$). Las rutas excretorias simuladas incluyen la orina, desde el compartimiento central, bilis-heces desde el hígado y la vía excretoria representada por pérdidas por piel, pelo y uñas, desde otros compartimientos de tejidos blandos.

D. *Submodelo de la probabilidad del plomo en sangre*, que aplica una distribución log-normal (con parámetros geométricos media y desvío estándar) para predecir la probabilidad de la ocurrencia de una concentración dada de plomo en sangre, en una población con similitudes a los niños expuestos estudiados.

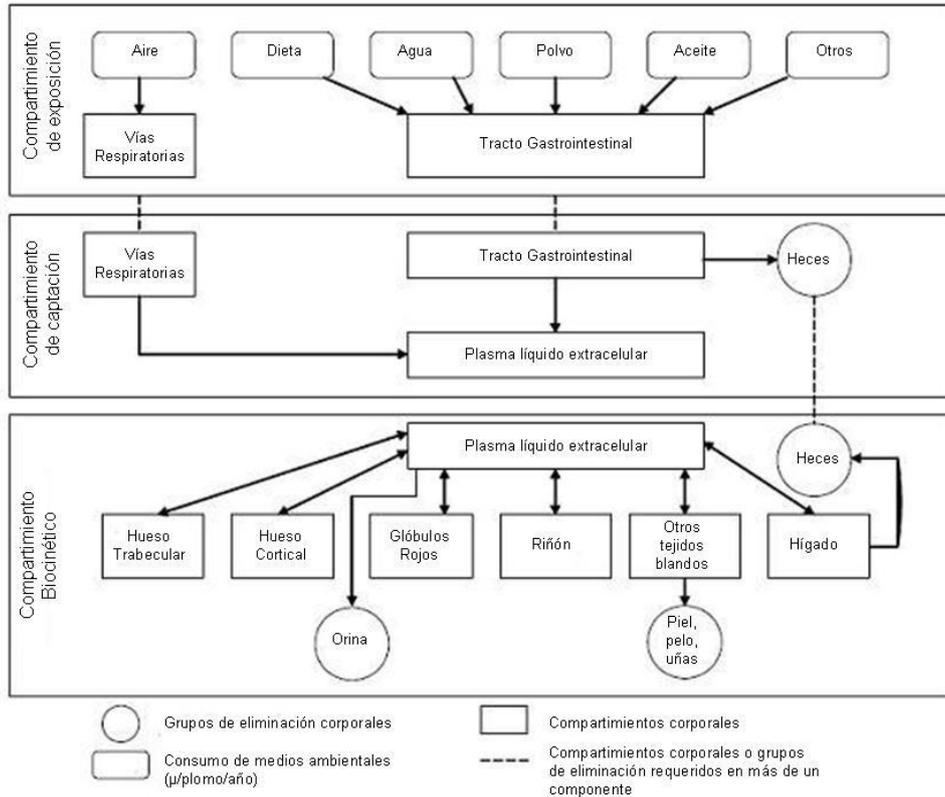
Las entradas al modelo IEUBK son puntos estimados destinados a representar los tiempos promedios de exposición centrales. La salida del modelo es una estimación de las concentraciones de plomo en sangre, para niños que pueden experimentar las exposiciones ingresadas. Sin embargo, dentro de un grupo de similitudes de los niños expuestos, las concentraciones de plomo en sangre deberían variar entre niños como resultado de la variabilidad interindividual en la ingesta, la absorción y la biocinética. El modelo simula el impacto combinado de estas fuentes de variabilidad como distribuciones log-normal de las

concentraciones de plomo en sangre para cada media geométrica de los resultados del modelo biocinético. La distribución log-normal también provee las bases para predecir la probabilidad de la ocurrencia de una concentración dada de plomo en sangre dentro de una población, con ciertas similitudes a los niños expuestos. El modelo puede ser iterado para varias concentraciones (por ejemplo, variando las concentraciones de plomo en el suelo) para predecir la concentración media que podría encontrarse, con una probabilidad de 0,05, por ejemplo, que la concentración de plomo en sangre exceda $10 \mu\text{g dl}^{-1}$. Los subsiguientes desarrollos del modelo utilizan la aproximación Montecarlo para simular la variabilidad, la incerteza en la exposición y en la absorción (Goodrum et al, 1996; Griffin et al. 1999). Esta ampliación del modelo, provee una alternativa al modelo de probabilidad para la incorporación, explicar y estimar la variabilidad (y por lo tanto, la incerteza en variabilidad) de la exposición y absorción, en la predicción de la concentración de plomo en sangre esperada.

El modelo IEUBK fue probado en comparaciones realizadas entre las predicciones del modelo sobre las concentraciones de plomo en sangre en niños y observaciones epidemiológicas realizadas en estudios de sitios de desechos peligrosos (Hogan et al., 1998).

Datos de animales y humanos (niños y adultos) describen la absorción, distribución, metabolismo, y excreción de plomo proveyendo las bases biológicas del modelo biocinético y valores de parámetros usados en este modelo IEUBK. El modelo está calibrado para predecir las masas compartamentales de plomo en niños de 6 meses a 7 años y no se lo propuso con la intención de ser usado en otras especies o grupos etarios.

Figura 10. Modelo esquemático IEUBK de la distribución de plomo en niños de hasta 7 años. (EPA, 1994)



1.12.4- El modelo de Leggett

Es un modelo clásico multicompartimental y farmacocinético de la ingesta de plomo y eliminación del mismo en niños y adultos (Leggett, 1993).

La Figura 11, muestra una representación del mismo incluyendo el movimiento de plomo desde los medios de exposición hacia los pulmones y tracto gastrointestinal, siguiendo por los intercambios entre el plasma difusible, los tejidos blandos, los compartimientos del hueso y la excreción desde el hígado, riñón y sudor. La estimación de la exposición al plomo fue incorporada en el modelo en forma dependiente de la edad, al estimarse el promedio diario de ingesta ($\mu\text{g día}^{-1}$) desde la inhalación y la ingestión.

El modelo incluye un compartimiento central, 15 compartimientos periféricos del cuerpo y tres *pools* de eliminación. El transporte de plomo desde el plasma sanguíneo hacia los tejidos se asume como una cinética de primer orden. Las constantes de velocidad de transferencia varían con la edad y con la concentración de plomo en sangre.

Al inicio, la concentración (función no lineal) en los glóbulos rojos, se asume que es de $60 \mu\text{g dl}^{-1}$, la constante de velocidad de transferencia hacia los glóbulos

rojos disminuye y las constantes de todos los otros tejidos aumentan proporcionalmente. Esto imita la relación no lineal observada en humanos, entre el plasma y los glóbulos rojos. El modelo simula el volumen de sangre como una función dependiente de la edad, que permite, a su vez, la simulación de las concentraciones de plomo en plasma y en sangre. Las masas de plomo son simuladas en los demás tejidos aunque no lo son los volúmenes de los diferentes tejidos (Leggett, 1993).

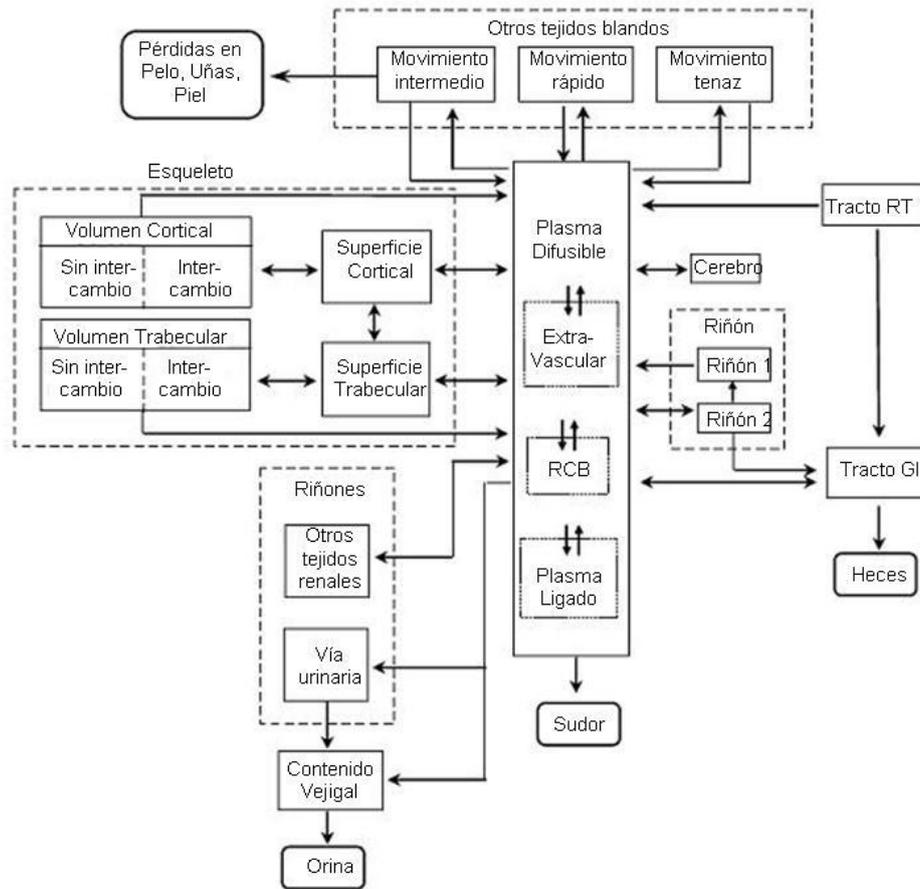
Las velocidades de primer orden unidireccionales (día^{-1}) entre compartimientos, fueron desarrolladas para seis grupos etarios y los valores para las edades intermedias se obtienen por interpolación lineal. La velocidad total de transferencia (que es la suma de todas las velocidades de transferencia desde el compartimiento central hacia todos los compartimientos) desde el plasma difusible a todos los destinos combinados se asume que es 2000 día^{-1} , basado en estudios realizados con trazadores isotópicos en humanos que recibieron plomo por vía inhalatoria o por inyección. Los valores de las velocidades de transferencia en tejidos y compartimientos tisulares se basan en las medidas de las fracciones depositadas o fracciones instantáneas extraídas de los compartimientos.

El modelo de Leggett fue originalmente diseñado como un modelo biocinético desarrollado para la Comisión Internacional sobre la Protección Radiológica (ICRP) para calcular las dosis de radiación de radionúclidos medioambientales más importantes, incluyendo los isótopos de plomo. Simula la fisiología dependiente de la edad del hueso y un rápido intercambio de plomo entre el plasma, la superficie del hueso y las lentas pérdidas a través de la resorción ósea. El volumen de hueso cortical (80% del volumen del hueso) y trabecular (20% del volumen del hueso) son simulados como compartimientos de la superficie del hueso, con un rápido intercambio con el plomo plasmático y volumen óseo, dentro del cual hay *pooles* intercambiables y no intercambiables. El plomo ingresa por el *pool* del volumen óseo desde la superficie del hueso y puede retornar a la misma o ingresar en un *pool* no intercambiable, desde el cual sólo puede retornar a la sangre mediante la resorción ósea. Las velocidades de transferencia de plomo en estos *pooles* varían con la edad para reflejar los cambios en el metabolismo óseo real.

El hígado es simulado por dos compartimientos; uno con un relativamente corto tiempo (rápido remoción) de ingreso de plomo desde el plasma y hacia el intestino por secreción biliar; el segundo simula, de modo más gradual, la transferencia hacia el plasma de aproximadamente el 10% del plomo ingresado al hígado. El riñón es simulado por dos compartimientos, uno que intercambia lentamente con el plasma sanguíneo, el plomo acumulado en el riñón, y un segundo compartimiento que recibe plomo desde el plasma y rápidamente lo

transfiere hacia la orina, sin acumularlo. Otros tejidos blandos son simulados como tres compartimientos representados por velocidades rápidas, intermedias y lentas de intercambio, sin una correlación fisiológica específica. Otras vías excretorias (como la piel, uñas y el pelo) se representan como vías de velocidad de recambio intermedio hacia los compartimientos de tejidos blandos.

Figura 11. Modelo esquemático de Leggett (1993) sobre la cinética de la distribución del plomo entre el compartimiento central plasma y los compartimientos de los diferentes tejidos (ATSDR, 2007).



1.12.5- Modelo experimental: estudios preliminares

En nuestro modelo, se considera al organismo representado por tres compartimientos básicos: uno central (la sangre) y dos compartimientos periféricos llamados profundo y superficial (tejidos o espacios de lento y rápido intercambio con la sangre respectivamente). El compartimiento profundo, está representado por muestras obtenidas de fémur de los animales, y el compartimiento superficial o de tejidos blandos, es representado por muestras obtenidas de hígado, riñón y bazo.

Cuando existe un rápido equilibrio en la distribución de un componente entre la sangre y los tejidos, es válido suponer que la cinética de distribución es de primer orden, es decir que, si bien hay dos compartimientos diferentes, el cambio en la concentración del componente estudiado en uno de ellos, provoca inmediatamente el cambio en la concentración del segundo, por lo que el equilibrio en las concentraciones resulta casi instantáneo. Este comportamiento, permite considerar al modelo como monocompartimental.

Se seleccionó el modelo de Rabinowitz et al. (1976) por ser un modo simplificado de representación de la ruta de un tóxico en el organismo, ya que no se utilizó información detallada del metabolismo y de los procesos biológicos.

Las Vías de excreción representadas en el modelo de Rabinowitz et al. (1976) desde el compartimiento central, incluye la urinaria y desde el compartimiento de tejido superficial, la bilis, sudor, pelo y uñas. En nuestro caso, debido a la vía de administración del tóxico, mediante inyecciones, podemos decir que la vía principal de eliminación es la orina, por lo que se considera nula o despreciable la eliminación por otra vía como la intestinal.

Este modelo no simula la distribución de plomo en la sangre (por ejemplo, los eritrocitos y plasma), ni simula sub-compartimientos dentro de los huesos o los procesos fisiológicos del recambio óseo que puedan afectar a la cinética del compartimiento de tejidos profundos (ATSDR, 2007).

Es importante destacar que el modelo no contempla la diferencias que pueden existir entre individuos, por ejemplo por la existencia de polimorfismos de ALAD puede alterarse el nivel de plomo en sangre y su excreción urinaria (Wu et al., 2003).

Objetivos

Los Objetivos de este trabajo, fueron los siguientes:

Estudiar comparativamente algunos aspectos toxicológicos de la exposición crónica al plomo inorgánico en un vertebrado inferior y en humanos:

En animales:

1. Estudiar la distribución del metal en diferentes compartimientos fisiológicos.
2. Profundizar en el conocimiento de los efectos adversos del plomo sobre diversos aspectos fisiológicos y bioquímicos del sistema hematopoyético.
3. Determinar las dosis letales para establecer las dosis subletales (DL 50) a dos temperaturas ambientales.
4. Establecer la distribución y acumulación del metal en los órganos blanco.

En humanos:

1. Determinar en una población laboralmente expuesta en forma crónica al metal, el estado de los parámetros hematológicos con énfasis en el metabolismo de Fe y del Hemo
2. Determinar la partición del plomo en diferentes compartimientos, factibles de ser evaluados mediante métodos no invasivos.

Delineamiento de un modelo toxicocinético:

1. Establecer un modelo preliminar de la distribución del plomo contrastando la información original lograda con datos de la literatura.

Materiales y Métodos

3.1- Estudios en animales (*Rhinella arenarum*)

3.1.1- Animales

3.1.1.1- Procedencia

Los sapos que se utilizaron en los experimentos descriptos a continuación, fueron capturados en las proximidades de la ciudad de La Plata, en una zona semiurbana (Figura 1) conocida como “Barrio Aeropuerto”. La misma, esta delimitada por las calles 80 y 90, 7 y 122, y se encuentra ubicada a 4 Km del centro cívico-comercial. Las dos últimas calles, son importantes vías de acceso a la ciudad desde el sur; la calle 122 posteriormente se transforma en la Ruta Provincial N° 11.

3.1.1.2- Aclimatación

A su arribo al laboratorio, se seleccionaron los sapos teniendo en cuenta su sexo, tamaño, peso y estado sanitario general. Se eligieron ejemplares machos adultos a los cuales, previa eliminación de la orina, se los pesó en una balanza de precisión de 1 g (Dolz, Alemania) y se dio inicio al período de aclimatación.

Los recipientes plásticos perforados conteniendo un sapo cada uno, fueron colocados en una cámara, con circulación forzada de aire, a temperatura ($20 \pm 2^\circ \text{C}$) y fotoperíodo (12D/12N) constantes, y se agregó 100 ml de agua potable, que se renovó una vez por día. Los animales permanecieron en ayunas y en las condiciones mencionadas durante una semana.

Este paso de aclimatación se realizó en todos los experimentos.

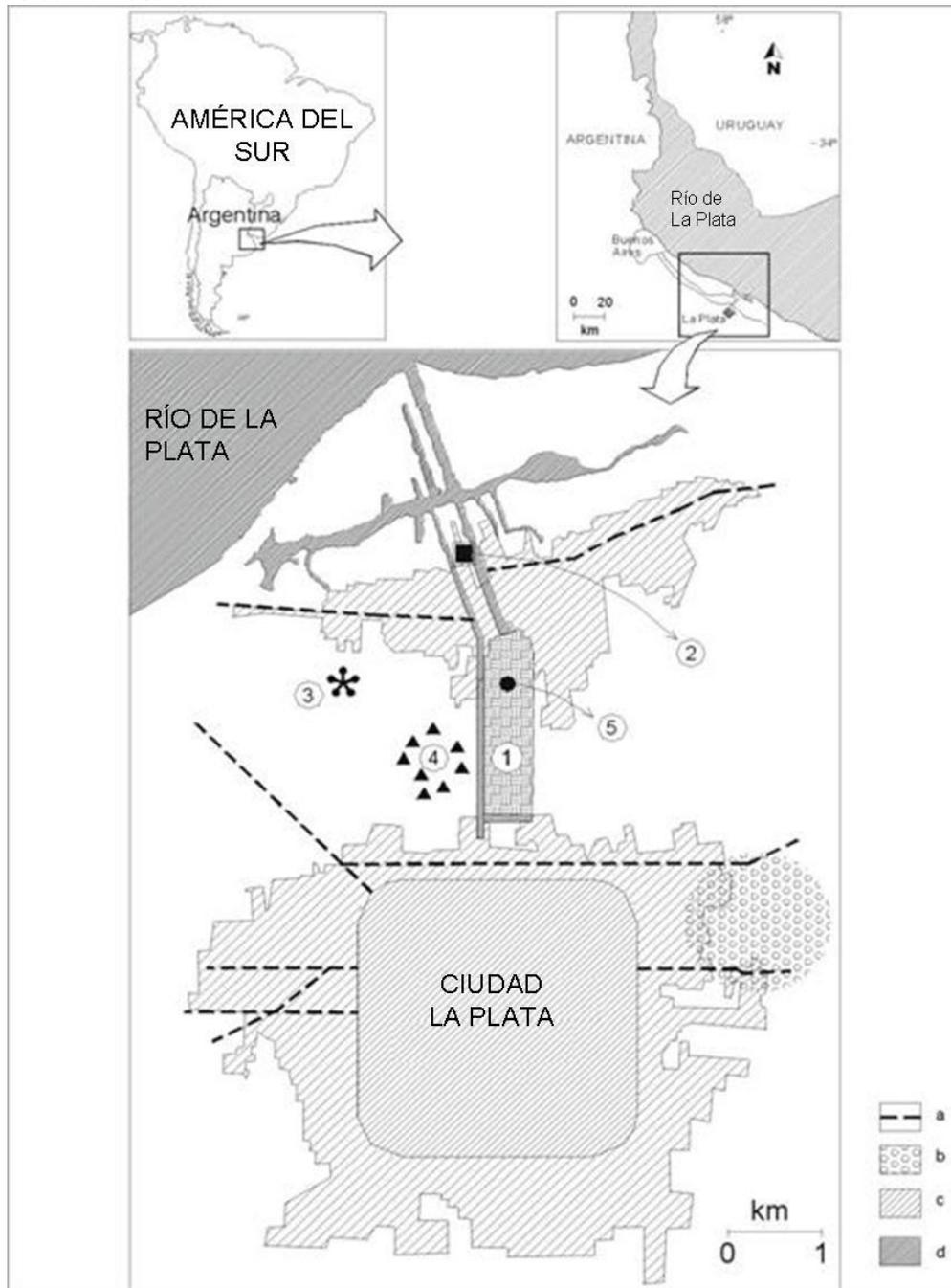
3.1.2-Plomo

3.1.2.1- Determinación de la concentración y contenido de Pb en las muestras

La medida del plomo en sangre venosa por espectrofotometría de absorción atómica es a la vez, el método más utilizado en los estudios de *screening* en la intoxicación por plomo y constituye el dato confirmatorio de la misma ya que es el parámetro utilizado en la definición de la intoxicación (Piomelli, 2003).

Mediante la utilización de este método, el plomo se midió en diferentes muestras (sangre, orina, órganos, y contenido intestinal) previa digestión de materia orgánica con HNO_3 concentrado.

Figura 12. Plano del área de procedencia de los animales. a. Vías principales; b. Área de estudio; c. Áreas urbanas y peri urbanas; d. Agua dulce; 1. Refinería; 2. Planta de coque de petróleo; 3. Molino de acero; 4. Industrias petroquímicas; 5. Antigua planta de ácido sulfúrico.



Todo el material de vidrio utilizado en las experiencias fue exhaustivamente lavado para asegurar la completa eliminación del plomo. Con tal fin, se siguió el procedimiento detallado en el Anexo I. Se utilizó exclusivamente vidrio borosilicato y plástico polipropileno.

La concentración de plomo en fluidos y el contenido en órganos, de los individuos seleccionados de acuerdo a los procedimientos del punto 3.1.1.2, se midió sobre alícuotas de 150-500 µl de sangre, 1 ml de orina y 5-100 µg de peso seco en el caso de órganos y contenido intestinal. El peso seco del órgano se determinó mediante la realización de ciclos de estufa a 100°C y posterior pesada, hasta que no existieron diferencias entre las lecturas sucesivas.

Todas las alícuotas fueron digeridas con ácido nítrico concentrado durante 12 hs. a temperatura ambiente y a continuación en baño de agua a 70° C, según métodos estandarizados (Viarengo y col., 1988). El proceso duró aproximadamente 2 horas, tiempo en el cual las soluciones se tornaron límpidas. Luego se filtró con papel de filtro Whatman nº1 y posteriormente de nitrocelulosa MSI 0,45 µm de poro, llevando a un volumen final con agua destilada desionizada Nanopura MiliQ (concentración de Pb < 0,006 mg l⁻¹).

La cuantificación de Pb se realizó, en la solución filtrada, por espectrofotometría de absorción atómica Varian Spectra AA 300 (Varian, Lexington, MA), con vaporización directa en llama de aire-acetileno (217 nm). La curva de calibración se realizó agregando solución de nitrato de Pb a muestras control con la misma matriz de las muestras experimentales, siguiendo las especificaciones de APHA-AWWA-WPCF (Clesceri y col., 1998). El límite de detección fue 0,1 mg Pb. dl⁻¹. Los resultados se expresaron en mg Pb. dl⁻¹ de sangre y µg Pb. g⁻¹ de peso seco del órgano.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado y todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3.1.2.2- Determinación del nivel sanguíneo basal de Plomo

El contenido de Plomo basal se determinó en muestras de sangre provenientes de sapos capturados en el área descrita en el punto 3.1.1.1, en 10 oportunidades diferentes e independientes entre sí. Los animales una vez llegados al laboratorio fueron aclimatados de acuerdo al procedimiento del

punto 3.1.1.2 y se tomó muestra de sangre por punción ventricular, en la semana posterior su arribo.

En uno de los muestreos, a un grupo de animales, se le realizaron 2 extracciones adicionales a los 13 y 26 días después de la primera.

La medida del Plomo en las muestras se realizó por el procedimiento descrito en el punto 3.1.2.1. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

Se obtuvo el Índice del contenido de plomo en los sapos, al dividir el nivel promedio del metal en sangre (en mg dl^{-1}) por el peso promedio de los animales (en g.) para cada muestreo realizado.

3.1.2.3- Determinación de Plomo en el suelo del hábitat de los animales

Se tomaron tres muestras representativas de suelo en el área de estudio, mencionada con anterioridad (punto 3.1.1.1), lugar donde los sapos fueron capturados, para determinar las condiciones del hábitat de los animales.

Las muestras se llevaron a peso constante en baño de arena a 95°C , y posteriormente digeridas con NO_3H concentrado y H_2O_2 , de acuerdo con recomendaciones de U.S.EPA (1986). Luego se siguió el procedimiento detallado en el punto 3.1.2.1. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron en mg Pb. kg^{-1} de peso seco.

3.1.2.4- Determinación de Plomo en el agua utilizada en los experimentos

Se determinó el nivel de Plomo en el agua utilizada en los recipientes plásticos donde se alojaron los sapos, en la utilizada en la limpieza del material y en el procedimiento analítico, según lo descrito en el punto 3.1.2.1, utilizando 1 ml de muestra de agua en todos los casos.

Del mismo modo, se procedió para determinar el nivel de plomo presente en la solución de acetato de sodio utilizada en los experimentos, para asegurar que no exista una incorporación no controlada.

En todos los casos, se analizaron las muestras por duplicado.

3.1.2.5- Determinación de Dosis Letales Medias (DL50) de Plomo

Para establecer los niveles de plomo a utilizar en las experiencias de distribución del metal en los diferentes compartimientos del organismo, se realizaron estudios de DL50 en *R. arenarum*.

Este parámetro se determinó en sapos que se aclimataron siguiendo el procedimiento del punto 3.1.1.2. Al término de la misma los animales fueron pesados en una balanza de 1 g de precisión (Dolz, Alemania) y mantenidos a 20 y 28,5 °C.

Los animales se dividieron a su vez, para cada temperatura, en dos grupos, en el primero recibieron una inyección única subcutánea de una solución acuosa de acetato de plomo (Ac_2Pb) y en el otro grupo utilizado como Control, fueron inyectados con acetato de sodio (AcNa) disuelto en agua destilada.

En ambas series se determinó el número de sobrevivientes para cada dosis y cada 24 h. durante 120 h. Las dosis de plomo ensayadas fueron 100, 200, 400, 600, 800, 1000 y 1200 mg kg^{-1} de peso corporal.

La DL-50 se determinó utilizando el software EPA probit analysis program, versión 1.5.

Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico.

3.1.2.6- Experimentos de distribución compartimental del sistema sanguíneo

Se utilizaron dos grupos de sapos: al grupo utilizado como Control se le inyectó AcNa , mientras que el grupo tratado con el metal recibió inyecciones de Ac_2Pb .

Las dosis subletales de Plomo inyectadas fueron, 100 y 600 mg kg^{-1} respectivamente y se estudió el efecto de la temperatura, realizándose los experimentos a 20 y 28,5°C.

Se obtuvo sangre mediante punción ventricular cardíaca. Se separó en fracciones por centrifugación a 3500 rpm, obteniendo plasma y el paquete globular.

Se analizaron las fracciones anteriormente mencionadas y la sangre entera a tiempos inicial y final (120 horas). Se considera la distribución del plomo que es incorporado solamente mediante las inyecciones por lo que a tiempo inicial, sólo se midió Plomo en la sangre entera.

En el tiempo final, los resultados de la determinación de Plomo en las fracciones, plasma y paquete globular, se expresaron en mg dl^{-1} de sangre entera.

Se realizaron estudios comparativos entre los grupos de *Rhinella arenarum* tratados con Ac_2Pb respecto de los grupos controles, mediante técnicas estadísticas descriptas en el apartado 3.4.

3.1.2.7- Distribución y acumulación del plomo en órganos

Para este experimento, se utilizaron sapos adultos de peso promedio 130 g que se aclimataron según lo descrito en el punto 3.1.1.2.

Cuando los animales llegaron al laboratorio, se obtuvo una muestra de sangre por punción ventricular utilizando heparina como anticoagulante para la determinación del plomo basal.

Se alimentaron con carne vacuna 1 vez a la semana y el agua se renovó diariamente utilizando las mismas condiciones de temperatura y período que en el período de aclimatación.

Luego los animales se separaron en dos grupos al azar. Uno de ellos, el de individuos Tratados, recibió inyecciones semanales de Ac_2Pb (dosis 50 mg Pb kg^{-1} peso, equivalentes al 6% de la DL 50) durante 5 semanas; el otro grupo, Control, recibió inyecciones de Ac Na en dosis equivalentes al primer grupo y con la misma frecuencia.

El volumen inyectado de Ac_2Pb y de Na , fue de 0.1-0.2 ml cada 100 g. de peso corporal.

En la sexta semana, es decir una semana después de recibir la última dosis, se tomaron muestras de orina por presión abdominal y se colectó sangre por punción ventricular. Además, los sapos previamente anestesiados con MS-222, fueron descerebrados y se les extrajeron el hígado, riñón, bazo y el fémur de la extremidad posterior derecha. También se colectó muestra del contenido intestinal.

Los órganos fueron llevados a peso seco en estufa a 100°C. La concentración de Plomo en las muestras se determinó sobre alícuotas de 150-500 µl (sangre), 1 ml (orina) y 5-100 µg peso seco (órganos y contenido intestinal), según la técnica descrita en 3.1.2.1.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.1.3- Parámetros bioquímicos

3.1.3.1- Determinación de la actividad de la δ -ALAD en sangre.

La δ -ALA dehidratasa (ALAD) es la primera enzima en la vía biosintética del grupo Hemo, así también es un punto clave de la regulación de la misma. Por su estructura, la enzima es uno de los más sensibles biomarcadores de exposición al plomo.

La actividad de la ALAD se determinó por duplicado de acuerdo a la técnica desarrollada en nuestro laboratorio, basada en el método Europeo Estandarizado (Berlin y Schaller, 1974; Perí et al, 1998). Los principales cambios introducidos en el ensayo consisten en el volumen de sangre utilizada y el pH de la reacción.

Se obtuvo sangre por punción cardiaca ventricular en jeringas heparinizadas y se colocaron las muestras en tubos de polietileno.

Los ensayos, fueron realizados en alícuotas 75 µl de sangre heparinizada, por duplicado. Se agregó 1,3 ml de agua y 1 ml del reactivo Buffer/sustrato de modo que el pH del medio de la reacción se ajustó a 5,4.

Se incubó a 38°C durante una hora y posteriormente, se detuvo la reacción con ácido tricloroacético al 10 %.

Se midió la absorbancia de las muestras a 555 nm, en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu modelo 1603 (Kyoto, Japón), 10 min. después del agregado del reactivo de Ehrlich. La actividad de la enzima presente en las muestras se expresó en $U\ l^{-1}$ de eritrocitos, teniendo en cuenta el valor del hematocrito obtenido siguiendo el procedimiento del punto 3.1.4.1.

3.1.3.2- Determinación de la concentración de la Protoporfirina Eritrocitaria Libre (PEL)

El bloqueo de la actividad de la enzima ferroquelatasa producido por el plomo conduce a la acumulación de su sustrato, PEL, que puede medirse espectrofluorométricamente, debido que la protoporfirina emite fluorescencia cuando es irradiada con luz ultravioleta. La fluorescencia emitida es proporcional a la concentración de protoporfirinas libres presentes en un extracto ácido, proveniente del equilibrio de partición entre el HCl y solventes orgánicos. Así, es posible cuantificar la magnitud de la intoxicación por plomo mediante la medida de PEL en la sangre de los individuos estudiados.

El nivel de PEL se midió siguiendo el procedimiento del método fluorométrico de Piomelli (1973). El mismo consiste en el agregado de 20 μ l de sangre entera obtenida en EDTA dipotásico, a 100 μ l de suspensión de tierra de diatomeas al 5% en solución salina (0,6% ClNa). Las muestras se procesaron por duplicado.

Posteriormente a la agitación en vórtex durante 10 seg., se agregó 2 ml de acetato de etilo: ácido acético (4:1). Se agitó el tubo en vórtex durante 10 seg. y se centrifugó por 30 seg. a velocidad media (1500 rpm). Se trasvasó el sobrenadante a tubos de hemólisis y se agregó 2 ml de HCl (1,5 N). Se agitó en vórtex 10 seg. y con pipetas Pasteur de vidrio se tomó de la fase clorhídrica (inferior) y se midió la intensidad de la fluorescencia en espectrofluorómetro, Aminco-Bowman SPF (Aminco, Silver Springs, MD) equipado con fuente de excitación de xenón de 150 W con espejo condensador elipsoidal y con fotomultiplicador Hamamatsu R928. Las longitudes de onda de excitación y emisión, fueron 394 y 606 nm respectivamente.

Se prepararon tubos blancos, procesados de manera idéntica que las muestras, pero reemplazando los 20 μ l de sangre por 20 μ l de solución fisiológica. Se utilizó una solución de referencia 0,015 μ g ml^{-1} de coproporfirina I. Para ello,

se pesó 5 µg de coproporfirina I (Sigma, St Louis, MO) a los que se agregó 10 ml de HCl 1,5 N y calentó 5 min a 100°C y, del mismo modo que en el caso de los blancos, se dispensó 20 µl de esta solución en reemplazo de la muestra y procedió de forma similar a los especímenes de *Rhinella arenarum*. Los resultados se expresaron en µg dl⁻¹.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3.1.4- Parámetros hematológicos

3.1.4.1- Determinación del hematocrito

Se utilizaron dos grupos de sapos, Controles e inyectados. Luego de la etapa de aclimatación (punto 3.1.1.2), se colectó una muestra de sangre en sapos anestesiados con MS-222, por punción cardíaca ventricular a todos los individuos. Finalmente se obtuvo una nueva muestra luego del tratamiento de la experiencia 3.1.2.7, para *R. arenarum* de ambos grupos.

Se determinó el hematocrito, a partir de la sangre colectada en tubos recubiertos con heparina sódica como anticoagulante. Se llenaron tres cuartas partes de capilares que luego de sellar un extremo a la llama de mechero se centrifugó durante 5 min. a 12000 rpm. Posteriormente, se leyó en un ábaco el valor del hematocrito (altura de la columna de hematíes). Los resultados fueron expresados como porcentajes del volumen ocupado por los hematíes (dado por la altura de la columna de hematíes), respecto al volumen total de la sangre entera (altura de la columna de sangre entera) (ICSH, 1993).

3.2- Estudios en humanos

3.2.1- Muestras

3.2.1.1- Procedencia

Las muestras se obtuvieron de un grupo de individuos de sexo masculino (N=26), en forma voluntaria, que se desempeñaban como trabajadores en una industria de los acumuladores de plomo, de la Provincia de Buenos Aires.

Previamente a la toma de muestras, se realizó una encuesta a los 26 individuos registrando la edad, el peso, la tarea desempeñada, antigüedad laboral y el horario de la jornada de trabajo.

Las edades estuvieron comprendidas entre 25 y 79 años, la antigüedad laboral, entre 3 y 24 años y todos cumplían una jornada de trabajo de 8 horas, realizando tareas en áreas de producción; algunos de ellos estaban afectados a tareas en áreas no involucradas en la producción.

El grupo Control estuvo integrado por 10 individuos de sexo masculino, cuyas edades oscilaban entre 25 y 45 años de edad, y habitantes de la misma localidad, no expuestos laboralmente al metal.

En ambos grupos, se obtuvo sangre por punción venosa que se utilizó para las determinaciones programadas.

La muestra de sangre se distribuyó en diferentes tubos para las distintas técnicas a realizar: sangre entera anticoagulada con EDTA dipotásico para hemograma y PEL; sangre entera anticoagulada con heparina sódica para la medida de la plumbemia y la actividad de la ALAD; sangre sin anticoagulante para la obtención de suero, obtenido por centrifugación de la muestra para la determinación de la ferremia. También se realizaron extendidos sanguíneos para su examen microscópico.

Las muestras, se mantuvieron refrigeradas hasta su llegada al laboratorio. La determinación de ALAD se realizó dentro de las 6 hs de obtenida la muestra. El hemograma se realizó el mismo día de obtenidas las muestras. Para la medida de PEL se colocó en tierra de diatomeas (Celite al 5% en solución fisiológica), una alícuota de las sangre anticoagulada con EDTA que

se conservó en heladera. Las demás determinaciones se realizaron a partir de muestras conservadas en freezer a -20°C.

3.2.2- Plomo

3.2.2.1- Determinación del nivel sanguíneo de plomo

Se procedió de manera idéntica al punto 3.1.2.1, pero en este caso el volumen de muestra utilizado fue de 500 µl de sangre heparinizada. Se prepararon controles con solución Standard de nitrato de plomo (J.T.Baker) que se agregó a muestras y procesaron del mismo modo que los especímenes.

3.2.2.2- Determinación del nivel urinario de Plomo

En el grupo de trabajadores, la plomburia se determinó en muestras de orina colectadas durante 24 h., en bidón con ácido nítrico, provisto por nuestro laboratorio junto con un instructivo impreso. Luego se procedió según el punto 3.1.2.1. Se prepararon controles con una solución Standard de nitrato de plomo (J.T.Baker) que se agregó a muestras de orina, y que fueron procesadas de modo idéntico al de los especímenes.

3.2.3-Parámetros bioquímicos

3.2.3.1- Determinación de la concentración de Protoporfirina Eritrocitaria Libre

Se determinó por el método de Piomelli, descrito en el punto 3.1.3.2.

3.2.3.2- Determinación de la actividad δ -ALAD en sangre

Las muestras de sangre heparinizada se procesaron de acuerdo con los procedimientos establecidos por Berlin y Schaller (1974), dentro de las seis horas de obtenidas y hasta entonces fueron mantenidas refrigeradas a 4°C. Se procedió de idéntica manera que en 3.1.3.1, excepto por que el volumen de muestra utilizada fue de 0,2 ml y el pH de la reacción fue de 6,4.

3.2.3.3- Determinación de la concentración de hierro sérico (ferremia)

La determinación de la concentración de hierro presente en el suero de los individuos, se determinó por el método colorimétrico directo, sin desproteización. El mismo se basa en la liberación del hierro de su proteína específica de transporte, la transferrina, por la acción de un buffer reductor de pH ácido (buffer acetato de pH 4,5 con ácido ascórbico como reductor) y la posterior formación de un complejo de color magenta entre hierro liberado y reducido, con un agente cromógeno como es la ferrozina. Este complejo puede revelarse por la medida espectrofotométrica a 560 nm. (NCCLS, 1998).

Las muestras de sangre sin anticoagulante obtenidas según lo indicado en 3.2.1.1, se incubaron en baño a 37°C durante 3 horas. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm. durante 15 min. Finalmente, se separó el suero en tubos de Kahn que se conservaron en freezer a -20°C hasta su procesamiento. A 500 μ l de muestra se le adicionó 2 ml de reactivo Buffer/reductor y se midió la absorbancia a 560 nm de estos tubos antes y luego de los 6 min de agregado del reactivo cromógeno (piridil bis-fenil triazina sulfonato) que al reaccionar con el hierro presente en la muestra da un complejo de coloración magenta.

Para las medidas, se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu S 1603 (Kyoto, Japón). Se prepararon tubos blancos que se procesaron del mismo modo que las muestras por duplicado, reemplazando los 500 μ l de muestra por idéntico volumen de agua bidestilada. También se prepararon tubos del Standard de hierro (Cl_3Fe equivalente a 100 $\mu\text{g dl}^{-1}$) por duplicado.

Los resultados obtenidos se compararon con datos de la literatura de Artaza et al. (1999).

3.2.4- Parámetros hematológicos

3.2.4.1- Estudio hematológico

La técnica se fundamenta en el recuento de las células por el método automatizado de apertura-impedancia, según Coulter (1956). Las células son forzadas a circular alineadas en hilera, mediante flujos hidrodinámicas generados por el equipo con los reactivos, haciéndolas pasar por un capacitor de placas planas paralelas. Cada vez que una célula, que es mala conductora de la electricidad, se ubica en el capacitor, interrumpe el campo eléctrico produciendo una caída del potencial, lo cual es traducido como una partícula. El equipo permite realizar los recuentos de las células sanguíneas de manera muy precisa, debido a la gran cantidad de células que son analizadas en un tiempo muy breve. También es posible conocer el volumen celular, debido a que la intensidad de la caída del potencial está en relación al mismo y determinar la concentración de hemoglobina por el método de cianmetahemoglobina.

Los parámetros evaluados por el autoanализador y que conforman el estudio hematológico, denominado en nuestro medio como “Hemograma completo” (traducción del inglés CBC: complete blood count), son los siguientes: Recuento de glóbulos blancos (GB), recuento de glóbulos rojos (GR), concentración de hemoglobina (Hb), valor hematocrito (Hto), volumen corpuscular medio (VCM), concentración de hemoglobina media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), ancho de distribución de tamaños (ADE o RDW), recuento de plaquetas (Plq) y volumen plaquetario medio (VPM).

Se utilizó, para este estudio, sangre entera anticoagulada con EDTA dipotásico, obtenida según el procedimiento detallado en 3.2.1.1, que se procesó de acuerdo a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH, 1987).

Los resultados obtenidos se contrastaron con datos de la literatura (Dacie-Lewis, 1995 y 2006).

3.2.4.2- Examen microscópico del frotis sanguíneo

Para el examen microscópico, se colocó la gota de la sangre que queda en la punta de la aguja, en las muestras obtenidas por punción venosa en un portaobjeto, según lo descrito en el punto 3.2.1.1. y con la cual se realizó el frotis sanguíneo, mediante el uso de un extensor. Este extendido sanguíneo, al llegar al laboratorio, se coloreó siguiendo la técnica de tinción de May Grunwald y Giemsa. La misma consiste en cubrir los extendidos con el colorante de May Grunwald durante 3 minutos, lavar con agua y posteriormente cubrir con buffer fosfato de pH 7,4 durante 1 minuto. Finalmente, se lava y cubren los extendidos con el colorante de Giemsa (diluido 1/10) durante 8 minutos.

Todos los frotis sanguíneos, se observaron con un microscopio óptico con objetivo de inmersión (100X).

3.3- Modelo de distribución de plomo en *Rhinella arenarum*

Luego de la revisión bibliográfica realizada y teniendo en cuenta los datos obtenidos de las experiencias de distribución de plomo en órganos de *Rhinella arenarum* (3.1.2.7), se estableció que el modelo de Rabinowitz et al. (1976), era el que mejor se ajustaba a las condiciones experimentales. En el mismo, se describen a órganos o grupos de órganos que comparten características similares, como *pooles* o compartimientos de idéntico comportamiento toxicocinético.

Una manera de simular la cantidad de plomo que se absorbe del entorno, es mediante la administración del metal en inyecciones. A cada una de estas inyecciones, se considera que son las dosis de plomo absorbido. Con este fin, se administraron inyecciones semanales de soluciones acuosas de acetato de plomo de 50 mg Pb kg^{-1} de peso corporal durante 5 semanas. Cada dosis, fue de aproximadamente el 6% de la LD50. El grupo control, recibió dosis equivalentes de acetato de sodio.

Supuestos del modelo:

1. Debemos suponer que esta absorción se realiza a una velocidad constante y que no existe saturación en el período de estudio.

2. Definir concentración ganada/día por órgano, para calcular las constantes de velocidad en cada órgano.
3. Restar el nivel de plomo en órganos en los controles. (T-C) esta diferencia es la acumulación de plomo en los diferentes órganos en los 42 días que duro la experiencia (tabla 25).
4. Definir la ganancia de plomo (acumulación) como la diferencia entre el contenido en órganos de individuos tratados respecto de los controles por día de experiencia y para cada órgano: dCPb/t total y dCPb/día. Calcular la ganancia diaria, dividiendo la acumulación de plomo en órganos por los días que duró el experimento (42 días).

Con las consideraciones utilizadas y con el modelo mencionado, se calcularon las constantes de acumulación de plomo en los diferentes órganos estudiados.

3.4- Métodos estadísticos

Para la comparación de los diferentes tratamientos se procedió al análisis de las medias de las medidas, mediante el test t de Student y análisis de varianza (ANOVA), utilizando el software StatgraphicsPlus (Manugistics Inc. Rockville, MD) y el software SPSS 10.0 (SPSS Inc, 1999). Se verificó previamente la normalidad y homogenicidad de la varianza. Cuando fue necesaria la aplicación de métodos no paramétricos, se utilizaron el test de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis. La significancia estadística se determinó con $p < 0,05$ La hipótesis nula (H_0) fue rechazada cuando $p < 0,05$.

Todos los datos se expresaron como media \pm error estándar. Los cálculos estadísticos del valor medio, el desvío estándar y el coeficiente de variación, fueron realizados con el programa Excel (Microsoft).

Se usó análisis de regresión lineal para investigar la correlación entre los parámetros estudiados. La significancia de las correlaciones fueron testeadas por el análisis de regresión (ANOVA) de un factor.

La DL-50 se determinó utilizando el software U.S.EPA probit analysis program, versión 1.5.

Resultados

4.1- Estudios en *Rhinella arenarum*:

4.1.1 – Plomo

4.1.1.1-Determinación del nivel sanguíneo basal de Plomo

Se midieron las plombemias en individuos seleccionados de *Rhinella arenarum*, capturados en las inmediaciones de la ciudad de La Plata y se calcularon los valores medios.

Los niveles de plomo hallados se mantuvieron sin variaciones importantes en los diez muestreos realizados (Tabla 6) en un período de casi tres años, excepto en la segunda (abril) y octava (agosto) toma de muestra, donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al promedio total (Figura 13). El análisis estadístico para la comparación de las varianzas de los valores medios, se realizó mediante el ANOVA de una variable.

Las ligeras variaciones observadas en el resto de los muestreos, no pudieron asociarse a factores como los diferentes períodos estacionales, con excepción de los valores más bajos obtenidos en abril. Los resultados oscilaron entre 1,99 y 4,66 mg Pb dl⁻¹.

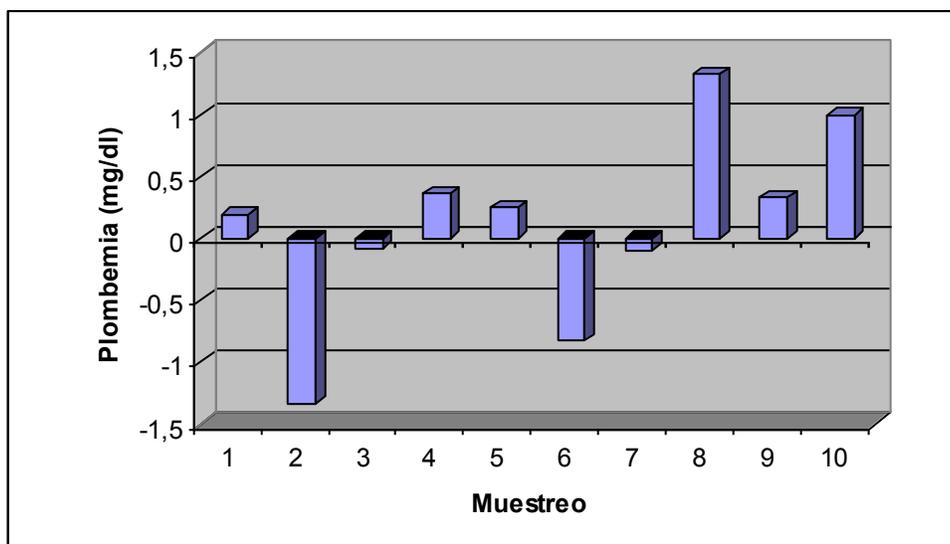
Tabla 6. Concentraciones de Pb en sangre obtenidas de ejemplares macho de *Rhinella arenarum* capturados en los alrededores de la ciudad de La Plata. Los datos se expresan como valor medio \pm DE.

Muestreo	N	Plombemia (mg dl ⁻¹)	Peso promedio (g)	Mes
1	9	3,52 \pm 0,61	129,0 \pm 4,9	Diciembre
2	16	1,99 \pm 0,24*	147,1 \pm 7,3	Abril
3	14	3,25 \pm 0,17	106,2 \pm 4,9	Mayo
4	40	3,69 \pm 0,13	154,3 \pm 4,5	Agosto
5	16	3,58 \pm 0,26	128,7 \pm 3,8	Octubre
6	19	2,50 \pm 0,19	121,4 \pm 5,8	Abril
7	15	3,23 \pm 0,22	142,8 \pm 7,9	Febrero
8	8	4,66 \pm 0,36*	159,9 \pm 7,2	Agosto
9	8	3,66 \pm 0,34	136,9 \pm 9,6	Octubre
10	7	4,33 \pm 0,52	143,6 \pm 2,4	Noviembre
Total y Promedio	152	3,33 \pm 0,09	138,0 \pm 2,4	

n = número de individuos.

* = valores significativamente diferentes al promedio ($p < 0,05$)

Figura 13. Diferencias encontradas, entre la media muestral y el promedio total obtenido en los 10 muestreos realizados en *Rhinella arenarum* capturados en los alrededores de La Plata.



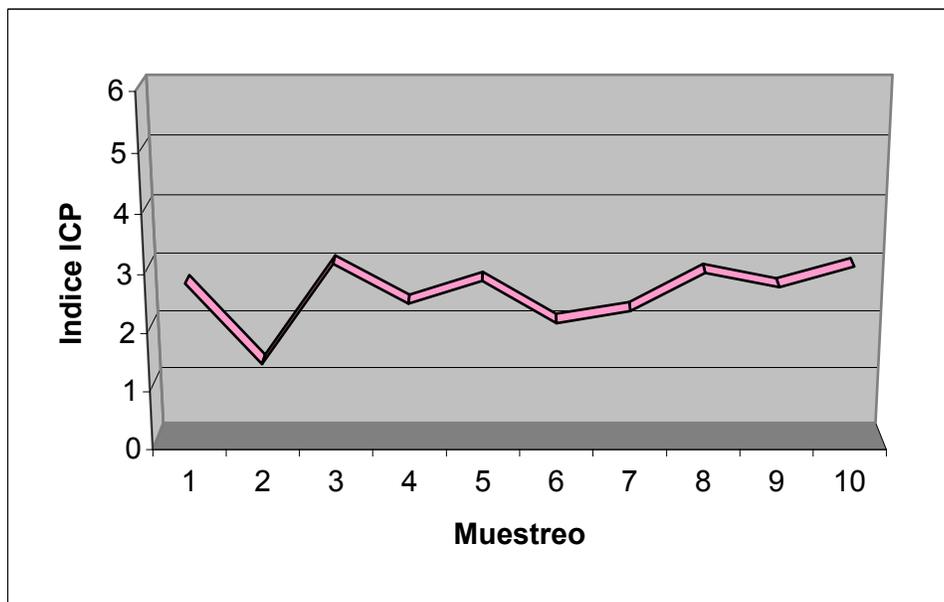
Nota: El valor promedio total fue $0,111 \pm 0,780 \text{ mg Pb dl}^{-1}$.

Se obtuvo un Índice de contenido de plomo (ICP) en los sapos, al dividir la concentración media del metal en sangre de los animales por el peso promedio en cada muestreo realizado:

$$\text{Índice ICP} = \text{Plombemia media (mg. dl}^{-1}) / \text{Peso promedio (g.)} * 100$$

El cálculo del ICP se realizó en busca de una expresión más sensible de los resultados. De este modo, con la inclusión de la variable peso, se consideran aspectos fisiológicos al considerar que el mismo está en relación a la edad del animal. Los valores obtenidos de este modo, se ilustran en la Figura 14, no encontrando diferencias significativas respecto de la media ($p > 0,05$), presentaron un valor medio de $2,52 \pm 0,53 \text{ mg dl}^{-1}$ y mostraron tener una variación mayor (20,8%) que los provenientes del análisis de los datos en cada uno de los muestreos analizados aisladamente (2,7%).

Figura 14. Valores del Índice del contenido de plomo (ICP) en sangre (mg dl^{-1}) en relación al peso promedio (g.) en *Rhinella arenarum*, calculados partir de diez muestreos independientes realizados en los alrededores de la ciudad de La Plata.

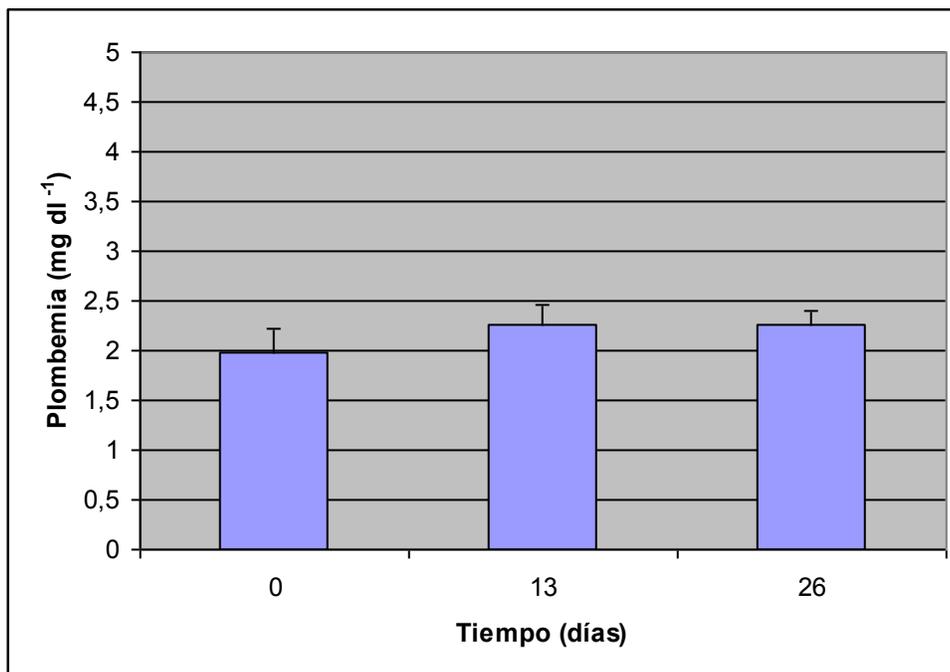


Durante el segundo muestreo, se obtuvieron especímenes adicionales de sangre de los animales capturados, a los 13 y a los 26 días de la primera extracción. Las diferencias entre estas medidas no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,05$) respecto de la primera (tiempo cero).

Esta experiencia se realizó con el fin de estudiar el efecto que tendría la manipulación de los sapos en el laboratorio, el proceso de aclimatación y el mantenimiento en recipientes plásticos con agua, sobre el nivel de plomo de los animales a corto plazo, así como también, documentar o cuantificar la eliminación del plomo en el período de estudio y establecer diferencias entre compartimientos de movilización rápida y lenta.

La Figura 15, muestra que el nivel de plomo en sangre se mantuvo constante, 26 días después del arribo de los animales al laboratorio y no viéndose alterado por las condiciones mencionadas de aclimatación y mantenimiento a las que estuvieron sometidos los sapos.

Figura 15. Niveles de plombemia obtenidos al arribo al laboratorio en el segundo muestreo (tiempo cero), y a los 13 y 26 días de la primera extracción de sangre, en *Rhinella arenarum* capturados en los alrededores de la ciudad de La Plata.



4.1.1.2- Estudio del hábitat de los animales. Determinación del contenido de Plomo en el suelo

Los niveles del contenido de plomo en muestras de suelo, obtenidas del lugar donde fueron capturados los sapos de las experiencias 3.1.2.2, se midieron con el fin de completar el estudio ambiental.

Las mediciones, se realizaron por duplicado en tres muestras representativas obtenidas en el suelo del hábitat de los sapos durante el 7^{mo} muestreo, realizado en el mes de febrero; los valores medio del contenido de plomo en el suelo en las muestras fueron 106,4; 105,8 y 24,1 mg Pb kg⁻¹ de peso seco, respectivamente. Mientras que los primeros provienen de zonas contaminadas, como los lechos de rutas, la última medida proviene de una zona tomada como control, alejada de las rutas y por lo tanto, “no contaminada”.

4.1.1.3-Determinación del contenido de Plomo en el agua utilizada en los experimentos, proveniente de diferentes fuentes

Se determinó el nivel de plomo en los diferentes tipos de aguas utilizadas en las experiencias, para evitar errores en las distintas mediciones, que conllevaría el uso de agua contaminada por el metal.

La concentración de plomo hallada en el agua destilada y nanopura fue $< 0,010 \text{ mg l}^{-1}$, mientras que en el agua de canilla se encontró que la concentración fue $< 0,150 \text{ mg l}^{-1}$, siendo el nivel permitido para el agua de red de $0,050 \text{ mg l}^{-1}$ (Ley 24051), es decir que la ley establece que debe ser 3 veces menor al obtenido. Estas mediciones realizadas previamente a la realización de las experiencias permitió la toma de las medidas adecuadas para evitar esta fuente de contaminación.

Se utilizó esta misma metodología con las soluciones de Acetato de sodio utilizadas en las experiencias, las cuales fueron administradas a los grupos de animales control. Estas soluciones, contenían una concentración máxima de plomo de $0,100 \text{ mg l}^{-1}$ que se consideró aceptable.

4.1.1.4- Determinación de Dosis Letales Medias (DL 50) de Plomo.

La dosis letal media (DL50) se determinó en sapos adultos de similar peso y talla, a dos temperaturas: 20 y $28,5^{\circ} \text{C}$.

Los animales ($129,0 \pm 4,2 \text{ g}$), recibieron una inyección subcutánea única, de una solución acuosa de acetato de plomo. Los individuos controles ($132,0 \pm 3,5 \text{ g}$), fueron inyectados con acetato de sodio disuelto en agua destilada.

En ambas series, se determinó el número de supervivientes para cada dosis, a intervalos de 24 hs, durante 120 hs en las experiencias a 20°C , y 168 hs a $28,5^{\circ}\text{C}$ (Fig. 16-19).

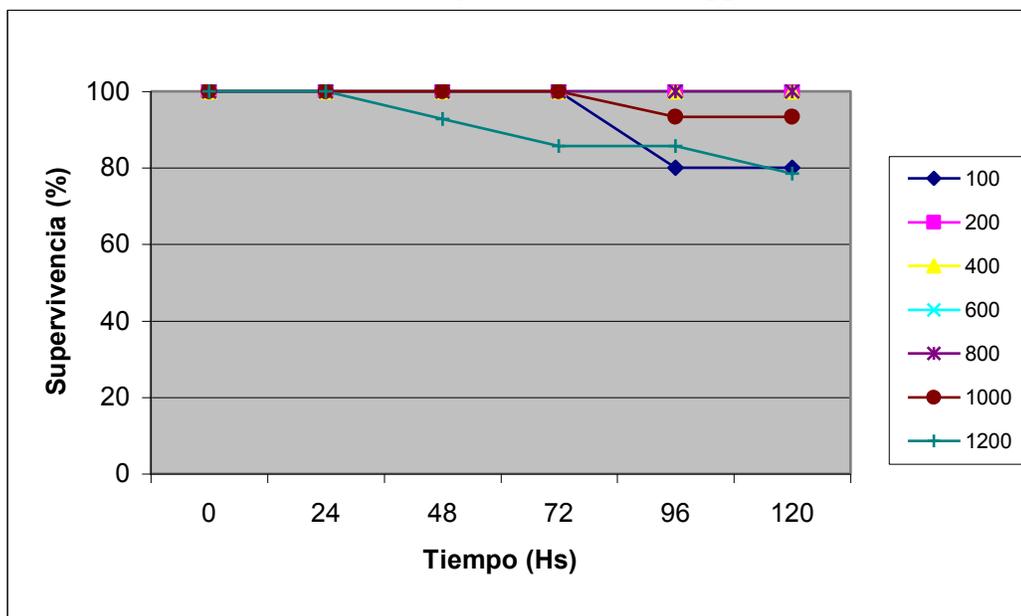
Las dosis de plomo ensayadas fueron 100, 200, 400, 600, 800, 1000 y 1200 mg Pb kg^{-1} (ppm) de peso corporal. La tabla 7, detalla el tamaño muestral utilizado en cada dosis ensayada, para los grupos controles y tratados, en ambas temperaturas. Para concentraciones medias y altas de Pb, el tamaño muestral fue elevado para asegurarse al final del experimento, un número de sobrevivientes tal que permitiera hacer las mediciones programadas.

Tabla 7. Dosis y tamaño muestral utilizados para determinar la DL- 50 del Pb (acetato) en *Rhinella arenarum* tratados con acetato de plomo y controles inyectados con dosis equivalentes de acetato de sodio, a dos temperaturas 20 y 28,5 ° C.

Dosis Inyectada	Temperatura							
	20°C				28,5°C			
	Controles		Tratados		Controles		Tratados	
Ppm	N _i	N _f						
100	5	4	5	5	3	3	7	7
200	5	5	5	5	3	3	4	4
400	15	15	15	15	9	9	10	9
600	12	12	12	12	9	9	10	6
800	16	16	18	11	14	14	13	2
1000	15	14	15	5	13	13	15	0
1200	14	11	14	2	10	10	13	2
Totales	82	77	84	55	61	61	72	30

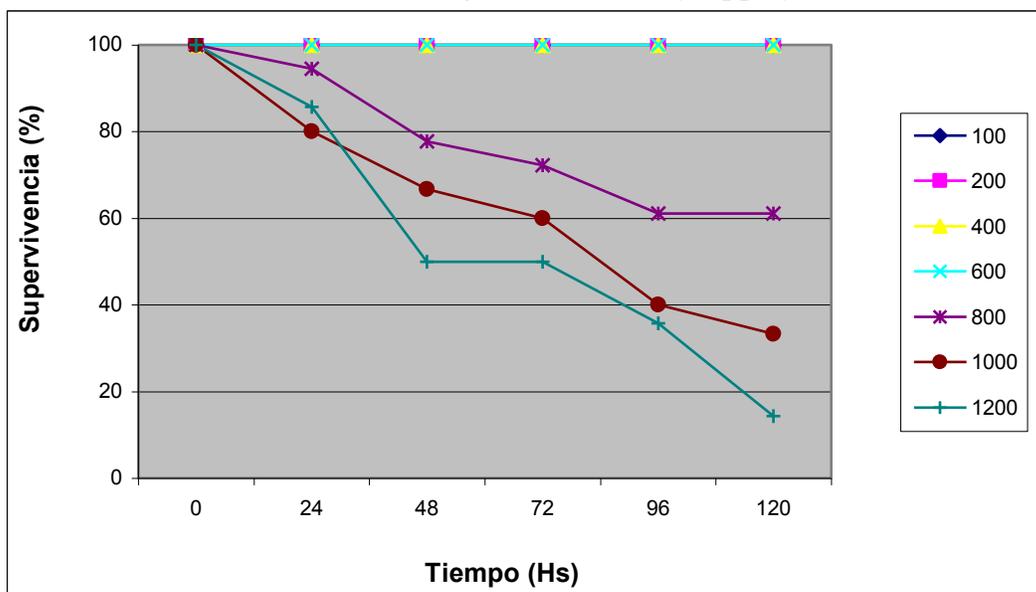
N_i: número inicial de individuos; N_f: número final de individuos.

Figura 16. Supervivencia del grupo control de *Rhinella arenarum* a 20°C en las diferentes dosis ensayadas de AcNa en ppm.



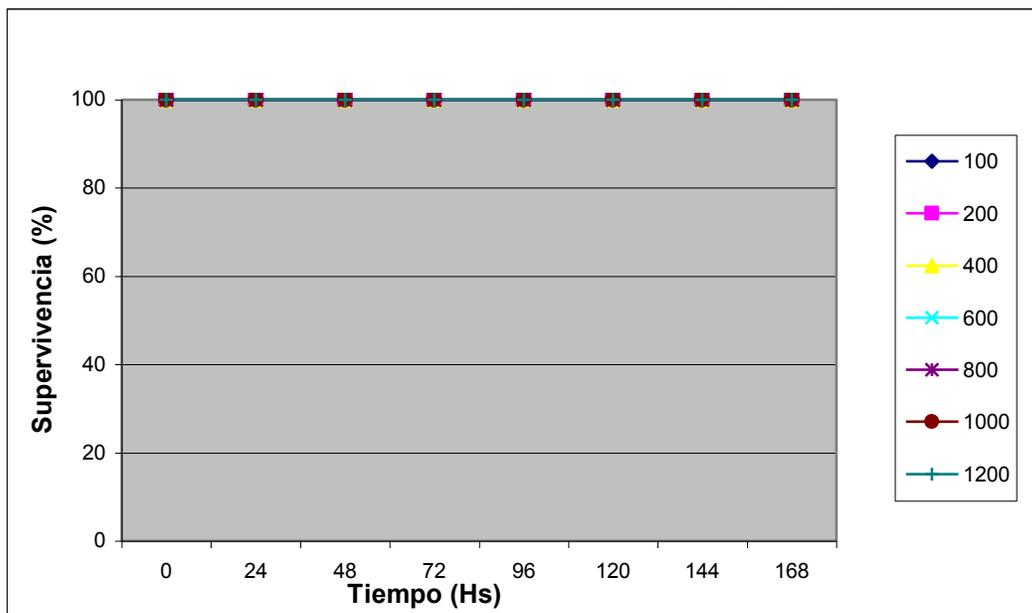
Se observa superposición de curvas, para los individuos controles debido a la alta tasa de supervivencia a esta temperatura y en las diferentes dosis de plomo ensayadas.

Figura 17. Supervivencia del grupo tratado de *Rhinella arenarum* a 20°C en diferentes dosis ensayadas de AcPb (en ppm).



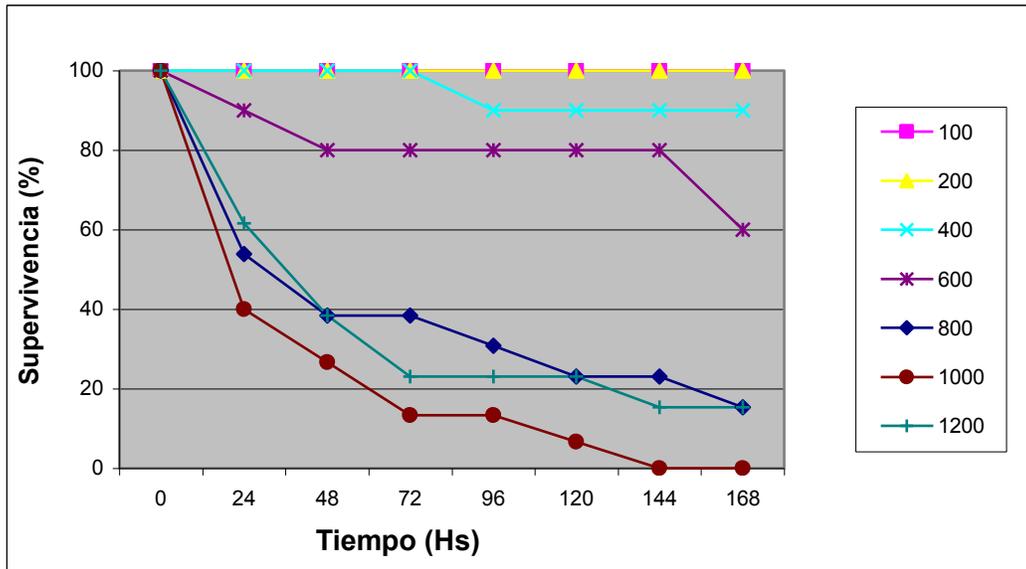
Existe superposición de curvas, para los individuos tratados, especialmente a dosis subletales. A dosis de 800 ppm o superiores se observa una disminución importante en la supervivencia a 20°C.

Figura 18- Supervivencia del grupo control de *Rhinella arenarum* a 28,5°C en las diferentes dosis ensayadas de AcNa (en ppm).



A la temperatura de 28,5°C, la supervivencia fue del 100% en el grupo control.

Figura 19. Supervivencia del grupo tratado de *Rhinella arenarum* a 28,5 °C en diferentes dosis Ensayadas de AcPb (en ppm).



Se observa un acentuada disminución de la supervivencia a esta temperatura para el grupo de animales tratado con el metal, a dosis superiores a 600 ppm. La DL 50 se determinó, para cada una de las temperaturas ensayadas, con los datos de las experiencias de toxicidad (de mortalidad y supervivencia) descriptos en la tabla 7, por medio del estadístico probit, con límites de confianza del 95% (Tabla 8).

Tabla 8. DL 50 expresada como valor promedio y límite de confianza de la misma, para cada temperatura ensayada. Datos expresados en ppm.

Temperatura (°C)	DL-50	Intervalo de confianza
20	908	802-1007
28,5	617	493-716

4.1.1.5- Experimentos de distribución compartimental del plomo en el sistema sanguíneo

Se utilizaron dos grupos de sapos: al grupo utilizado como control se le inyectó acetato de sodio, mientras que el grupo tratado fue inyectado con acetato de

plomo. Las dosis (subletales) de plomo administradas fueron 100 y 600 ppm respectivamente.

Se tuvo en cuenta la temperatura, realizándose las experiencias a 20 y 28,5 °C. Se informan los datos al tiempo final de las experiencias (120 h).

Los resultados de las mediciones en todas las fracciones se expresan en mg de Pb dl⁻¹ de sangre entera para poder realizar una comparación adecuada entre las mismas (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración de plomo (expresado en mg de plomo dl⁻¹ de sangre entera, SE) en los diferentes compartimientos de los especímenes de *Rhinella arenarum*, controles y tratados con plomo y mantenidos a 20°C y 28,5°C. Los datos se expresan como el valor medio ± DE.

Temp. (°C)	Tratamiento Individuos	Ni	Nf	Concentración de Pb inyectada (ppm)	Plasma	Paquete Globular	Suma de fracciones	Sangre entera
20	C ^a	4	4	100	0,91 ± 0,35	0,76 ± 0,78	1,67 ± 1,09	1,44 ± 1,529
	C ^b	3	3	600	0,85 ± 0,14	0,48 ± 0,03	1,33 ± 0,13	0,91 ± 0,172
	T ^c	5	5	100	1,24 ± 0,24	1,92 ± 0,43	3,15 ± 0,33	3,53 ± 1,490
	T ^d	6	6	600	1,26 ± 0,12	2,64 ± 1,69	3,90 ± 1,74	4,21 ± 1,708
28,5	C ^e	3	3	100	0,68 ± 0,18	0,54 ± 0,21	1,22 ± 0,37	0,96 ± 0,122
	C ^f	3	3	600	0,50 ± 0,07	0,56 ± 0,08	1,05 ± 0,02	0,75 ± 0,068
	T ^g	6	6	100	1,07 ± 0,13	2,5 ± 1,21	3,56 ± 1,32	3,67 ± 1,014
	T ^h	6	1	600	1,07 ± 0,00	2,74 ± 0,00	3,81 ± 0,00	ND

Referencias: C: controles, T: tratados. Ni: número inicial de individuos. Nf: número de individuos sobrevivientes. ND: no determinado

Se estudió el efecto de la temperatura mediante un análisis ANOVA de dos variables entre grupos, obteniéndose los siguientes resultados: entre los controles inyectados con 100 ppm Ac Na (C^a y C^e), $p = 0,613$; controles inyectados con 600 ppm Ac Na (C^b y C^f), $p = 0,222$; entre los grupos tratados con 100 ppm de Ac Pb (T^c y T^g), $p = 0,867$ y entre tratados con 600 ppm de Ac Pb (T^d y T^h), $p = 0,837$; es decir que no hay diferencias estadísticas significativas entre las dos temperaturas .

De la Tabla 9, surge que los porcentajes de plomo transportados en plasma respecto al medido en la suma de fracciones de individuos tratados con el metal

fueron: a 20°C, 39 % (100 ppm) y 32% (600 ppm); a 28,5°C, 30% (100 ppm) y 28% (600 ppm), con lo que se observa una mínima influencia de la temperatura, al aumentar la temperatura disminuye el plomo transportado en plasma. En el paquete globular, se observa que el plomo transportado fue respecto al obtenido en la suma de fracciones: a 20°C, 60% (100 ppm) y 67% (600 ppm); a 28,5°C, 69% (100 ppm) y 71% (600 ppm), observándose que en este caso la influencia de la temperatura es prácticamente nula (mínimamente positiva).

Los valores de las relaciones T/C encontradas en plasma fueron: a 20°C, 1,36 (100 ppm) y 1,48 (600 ppm); 28,5°C, 1,57 (100 ppm) y 2,14 (600 ppm). Dichas relaciones en el paquete globular fueron: a 20°C, 2,52 (100 ppm) y 5,5 (600 ppm); 28,5°C, 4,63 (100 ppm) y 4,89 (600 ppm). Se observa que existe un efecto positivo de la temperatura con la dosis inyectada, para el plomo transportado en plasma y en paquete globular a 20°C, pero a 600 ppm existió saturación que hizo que no exista dependencia con la temperatura a esta dosis inyectada.

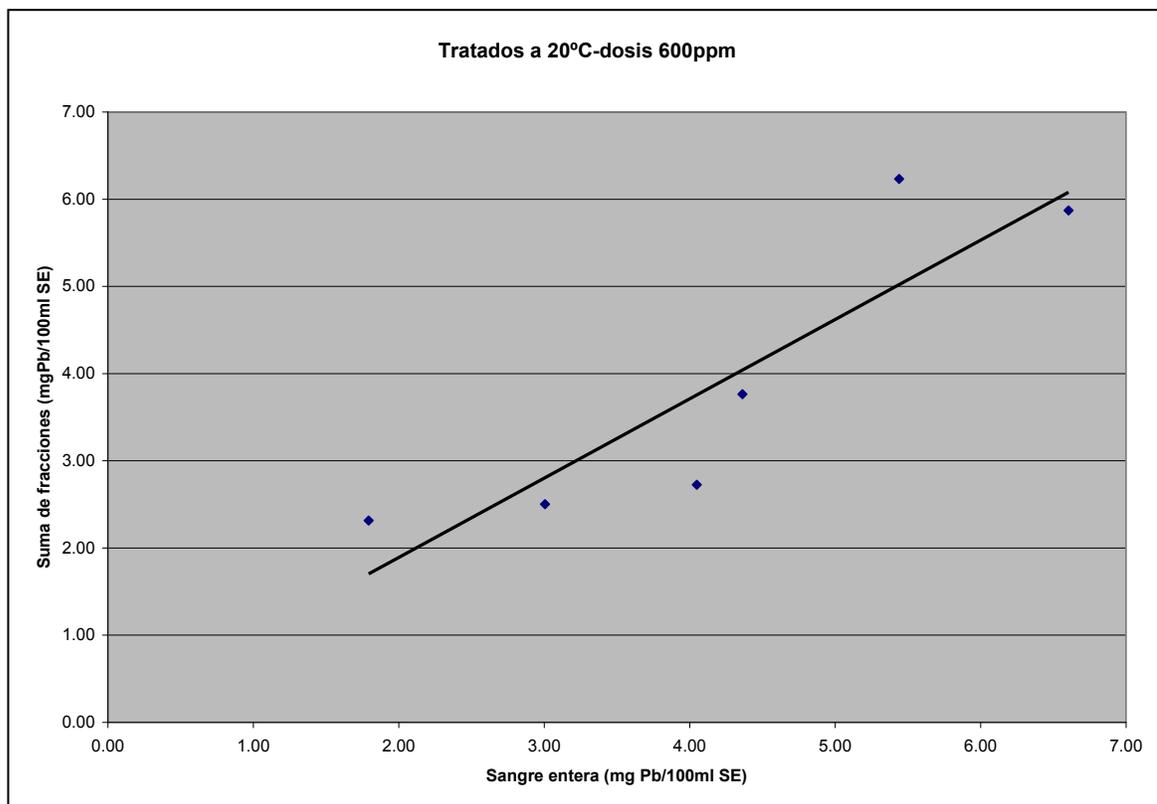
También se vio que la temperatura produciría un aumento del efecto tóxico del plomo, como pudo demostrarse en el porcentaje de individuos que sobrevivieron en las experiencias de distribución, siendo la dosis de 600 ppm muy próxima a la DL50 a la temperatura de 28,5°C (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de la dosis y la temperatura sobre la supervivencia de *Rhinella arenarum* en las experiencias de distribución de plomo.

Dosis	Tratamiento	20°C	28,5°C
100ppm	Controles	100%	100%
	Tratados	100%	100%
600ppm	Controles	100%	100%
	Tratados	100%	16%

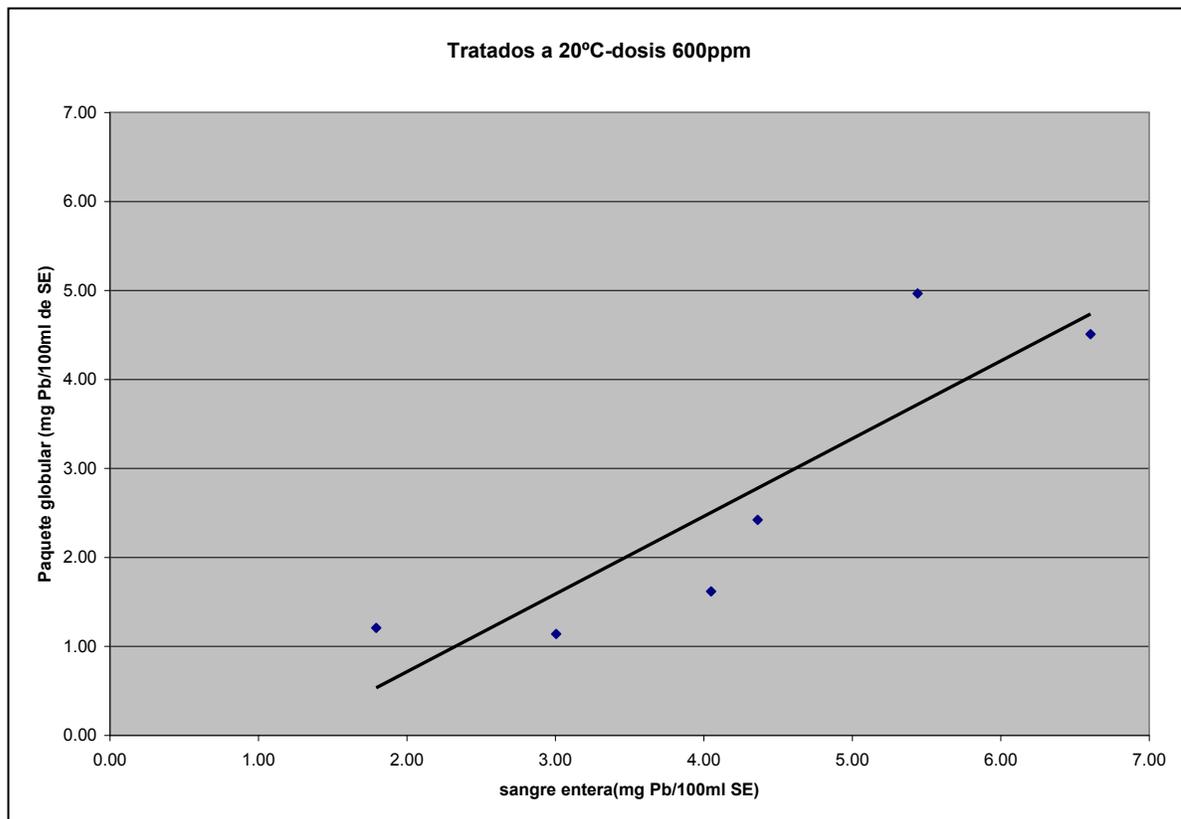
En las siguientes Figuras (20-24), se presentan las relaciones positivas de los estudios de regresión, obtenidos a partir de la comparación entre las diferentes mediciones de los niveles de Pb en las distintas fracciones: plasma, paquete globular (GR) y la suma de las mismas (suma de fracciones), con las concentraciones del metal medidos en la sangre entera a 20 °C y 28,5°C. En todos los casos se expresaron los resultados en mg Pb dl⁻¹ de sangre entera (SE), y gráficamente en una escala similar, a los efectos de facilitar la comparación.

Figura 20. Regresión entre la plombemia y el nivel de plomo hallado en la suma de las fracciones del sistema sanguíneo de *Rhinella arenarum*, en individuos inyectados con 600 ppm de plomo a 20°C. Los resultados se expresan en mg de Pb dl⁻¹ de sangre entera.



La ecuación de regresión obtenida fue la siguiente:
para 600 ppm, $Y = 0,9101X + 0,0694$, $R^2 = 0,795$; $R = 0,891$; $p = 0,017$

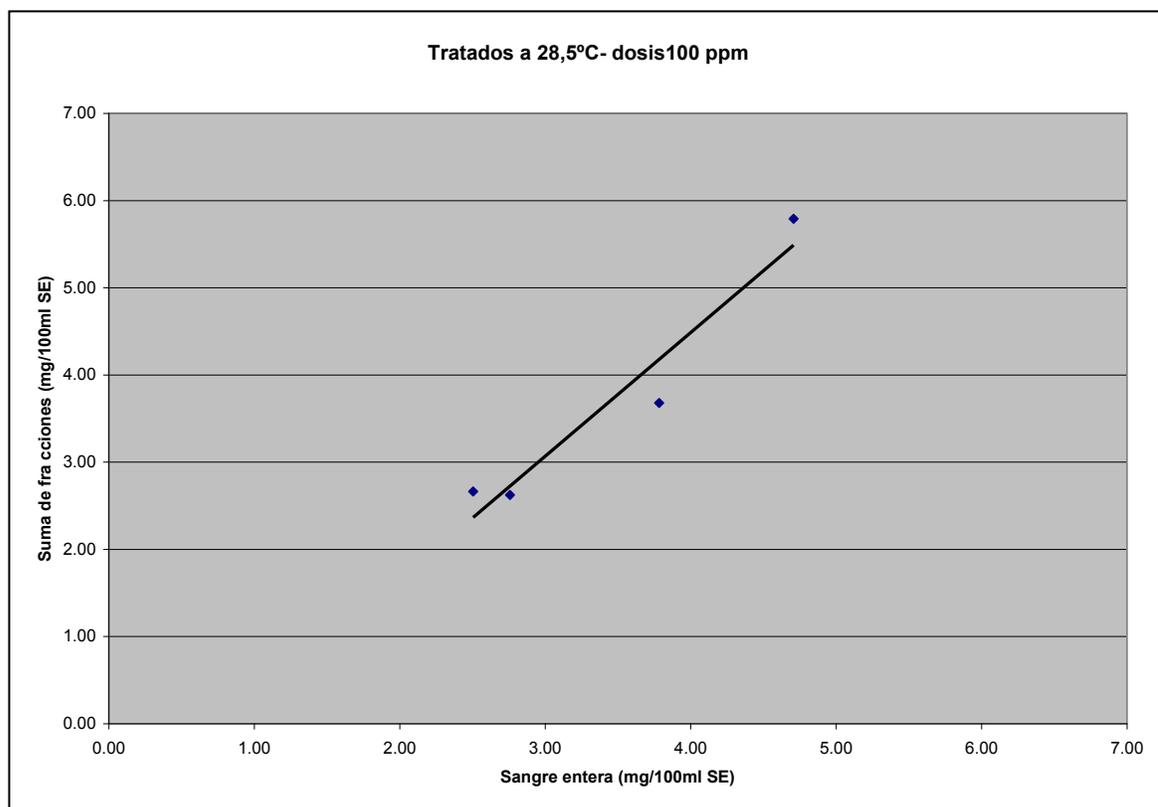
Figura 21. Regresión entre la plombemia y el nivel de plomo hallado en el paquete globular (GR) de *Rhinella arenarum*, individuos tratados con 600 ppm de plomo a 20°C. Los resultados se expresan en mg de Pb dl⁻¹ de sangre entera (SE).



La ecuación de regresión obtenida fue la siguiente:
para 600 ppm, $Y = 0,8732X - 1,0323$, $R^2 = 0,7779$; $R = 0,8820$; $p = 0,20$

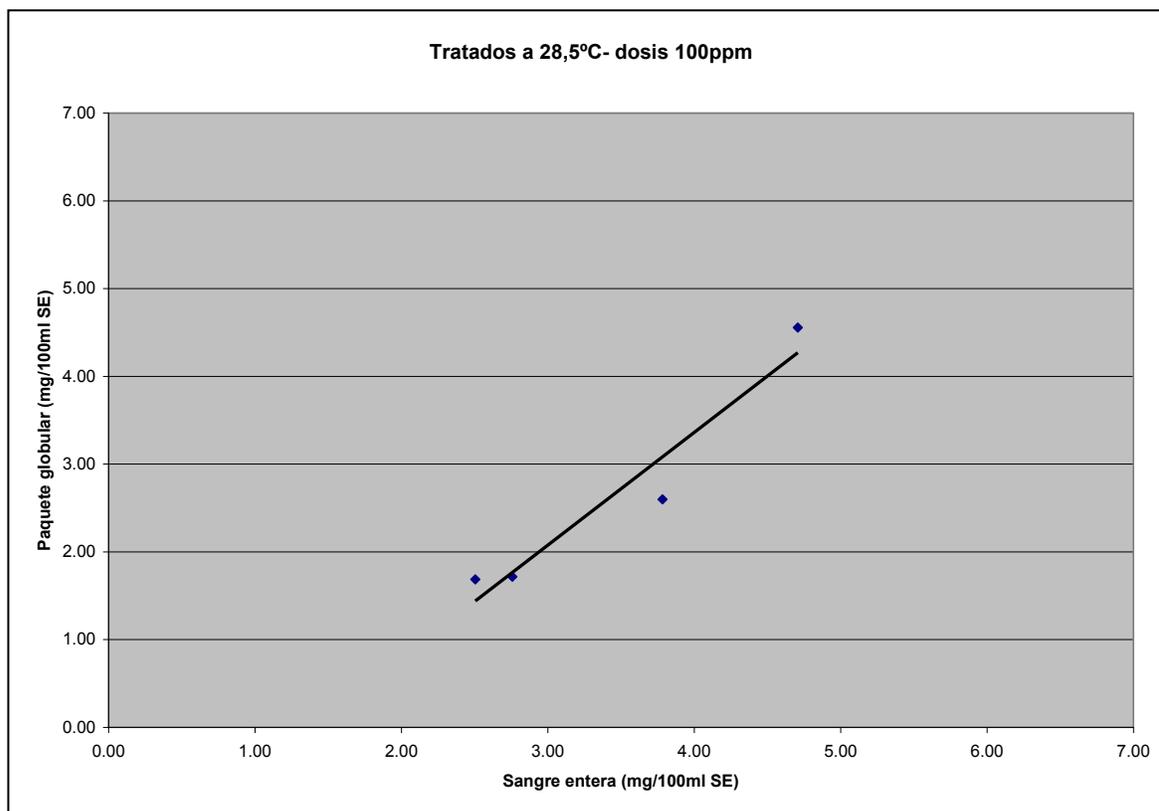
Las siguientes figuras (Figs. 22-24) relacionan los niveles de plomo obtenidos en las fracciones: plasma, paquete globular (GR) y la suma de las mismas, respecto la concentración del metal determinado en sangre entera a 28,5 °C.

Figura 22. Regresión entre la plombemia y el nivel de plomo medido en la suma de las fracciones del sistema sanguíneo de *Rhinella arenarum*, en individuos tratados con 100 ppm de plomo a 28,5°C. Los resultados se expresaron en mg Pb dl⁻¹ de SE.



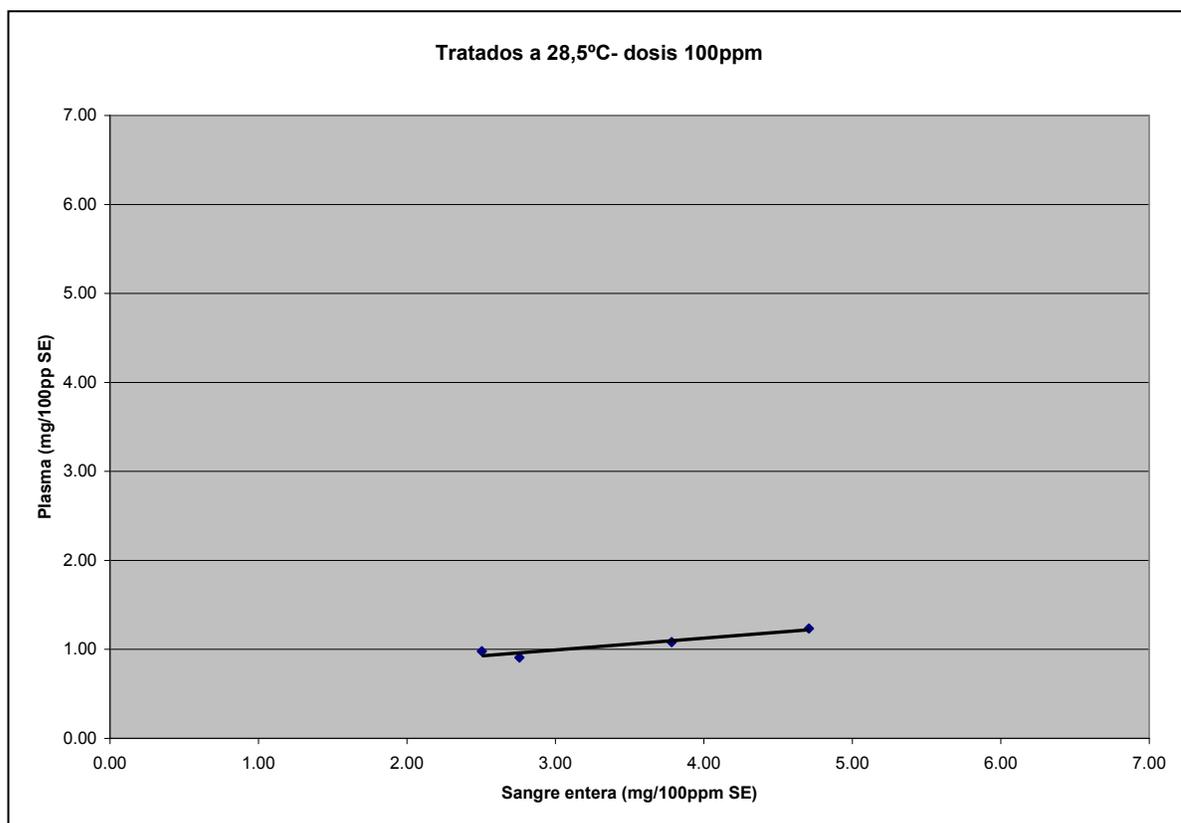
La ecuación de regresión obtenida fue la siguiente:
para 100 ppm, $Y = 1,4179X - 1,1865$, $R^2 = 0,9335$; $R = 0,9662$; $p = 0,033$

Figura 23. Regresión entre la plombemia y el nivel de plomo medido en el paquete globular (GR) del sistema sanguíneo de *Rhinella arenarum*, en individuos tratados con 100 ppm de plomo a 28,5°C. Los resultados se expresaron en mg Pb dl⁻¹.



La ecuación de regresión obtenida fue la siguiente:
para 100 ppm, $Y = 1,2847X + 1,7789$, $R^2 = 0,9301$; $R=0,9644$; $p =0,035$

Figura 24. Regresión entre la plombemia y el nivel de plomo medido en el plasma del sistema sanguíneo de *Rhinella arenarum*, en individuos tratados con 100 ppm de plomo a 28,5°C. Los resultados se expresaron en mg Pb dl⁻¹.



La ecuación de regresión obtenida fue la siguiente:
 para 100 ppm, $Y = 0,1332X + 0,5924$, $R^2 = 0,9039$; $R = 0,9507$; $p = 0,052$

En la Tabla 11, puede apreciarse el efecto de positivo de la dosis y la temperatura en la absorción del plomo, ya que las concentraciones medidas en SE y fracciones a 600 ppm siempre fueron superiores. La concentración de plomo en SE, no pudo medirse a 600 ppm y 28,5°C, debido a que las condiciones fueron cercanas a la DL 50 a esta temperatura.

Tabla 11. Relaciones de las concentraciones de Pb medidas en individuos de *Rhinella arenarum* tratados y controles (T/C), en función de la dosis y la temperatura.

Dosis (ppm)	T (°C)	SE	Plasma	GR	Suma de fracciones
100	20	2,5	1,4	2,5	1,9
600	20	4,6	1,5	5,5	2,9
100	28,5	3,8	1,6	4,6	2,9
600	28,5	-	2,1	4,9	3,6

En la Tabla 12, puede observarse el incremento de la absorción del plomo (1,0-1,4 veces) entre las diferentes dosis, para los individuos tratados con el metal. Siempre fue mayor a 600 ppm para una misma temperatura.

Tabla 12. Relación de la absorción de Pb entre dosis (600/100) para una misma temperatura.

Grupo	T (°C)	SE	Plasma	GR	Suma de fracciones
Controles	20	0,6	0,9	0,6	0,8
Tratados	20	1,2	1,0	1,4	1,2
Controles	28,5	0,8	0,7	1,0	0,9
Tratados	28,5	-	1,0	1,1	1,1

4.1.1.6- Distribución y acumulación de Plomo en órganos

La acumulación de plomo en estos órganos se muestra en la Tabla 13, expresada como la relación T/C. Puede verse que en el período evaluado, existió una mayor concentración del metal en los órganos blandos como el hígado, riñón y bazo, que en órganos duros como hueso.

Tabla 13. Contenido de Pb en órganos, en el grupo control (C) y el tratado (T) con Ac Pb. Se ordenaron los datos en función de la relación T/C, en sentido descendente. El contenido del metal se expresa como media \pm DE (μ g)

Órgano	Nc	Controles (C)	Nt	Tratados (T)	T/C	p
Hígado	17	15,9 \pm 4,0	26	6995,1 \pm 806,7	439,94	< 0,01
Riñón	17	6,5 \pm 0,9	26	156,4 \pm 27,0	24,06	< 0,01
Bazo	17	8,3 \pm 1,5	26	74,8 \pm 7,1	9,01	< 0,01
Femur	17	7,7 \pm 2,3	26	25,5 \pm 6,1	3,31	< 0,05

Nº de individuos: Nc = 17, Nt = 26

En la Tabla 14 y en la Figura 25, se muestran las concentraciones de plomo obtenidas y el contenido del metal en los diferentes órganos estudiados.

Tabla 14. Medidas de plomo en órganos de *Rhinella arenarum* tratados con acetato de plomo (T) y en un grupo control (C). Los resultados se expresan como media \pm DE (n).

	Hígado		Riñón		Bazo		Fémur	
	C	T	C	T	C	T	C	T
Conc de Pb (ug g-1 peso seco)	16,0 \pm 3,8 (17)	6116,2 \pm 876,9 (26)	138,9 \pm 24,6 (17)	1158,6 \pm 112,1 (26)	393,5 \pm 66,3 (17)	3469,3 \pm 386,7 (26)	9,0 \pm 2,6 (17)	27,4 \pm 6,3 (26)
Contenido total de Pb (ug)	15,9 \pm 4,0 (17)	6995,1 \pm 806,7 (26)	6,5 \pm 0,9 (17)	156,4 \pm 27,0 (26)	8,3 \pm 1,5 (17)	74,8 \pm 7,1 (26)	7,7 \pm 2,3 (17)	25,5 \pm 6,1 (26)
Masa (g de peso seco)	1,024 \pm 0,069 (17)	1,354 \pm 0,118 (26)	0,057 \pm 0,005 (17)	0,075 \pm 0,006 (26)	0,029 \pm 0,007 (17)	0,025 \pm 0,002 (26)	0,768 \pm 0,043 (17)	0,833 \pm 0,005 (26)

Figura 25. Contenido de plomo en órganos y porcentaje de acumulación del metal en *Rhinella arenarum* tratados con el metal durante 5 semanas.

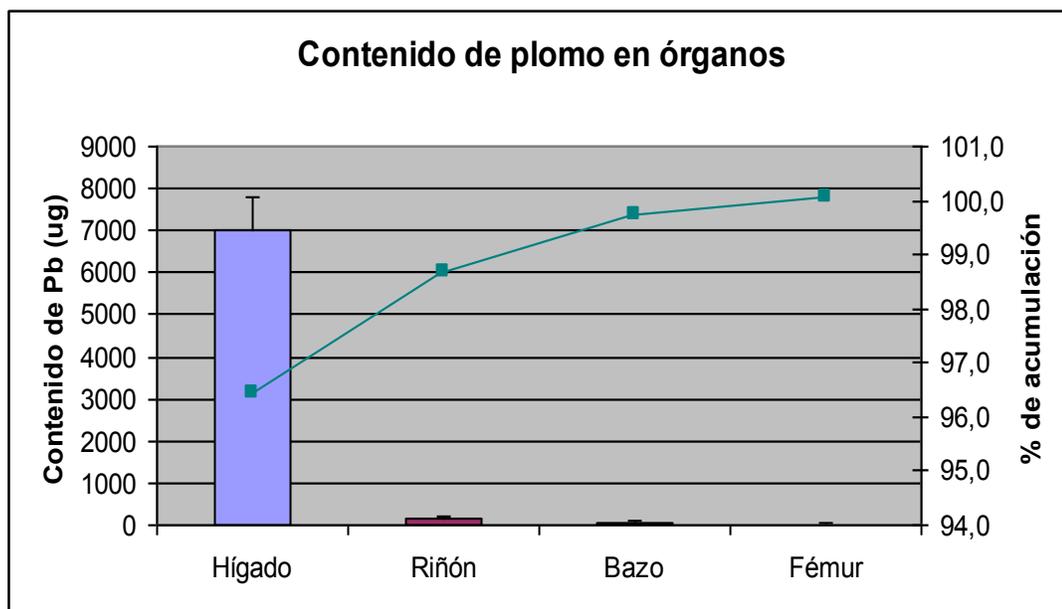


Figura 26. Diferencias encontradas entre las concentraciones de plomo en animales inyectados con AcPb (T) y controles inyectados con AcNa (C), expresadas como cociente T/C. El órgano blando de mayor acumulación de Pb fue el hígado, que presentó una relación T/C máxima=382,3 por lo que presenta una escala diferente a la del resto de los órganos y materiales de excreción.

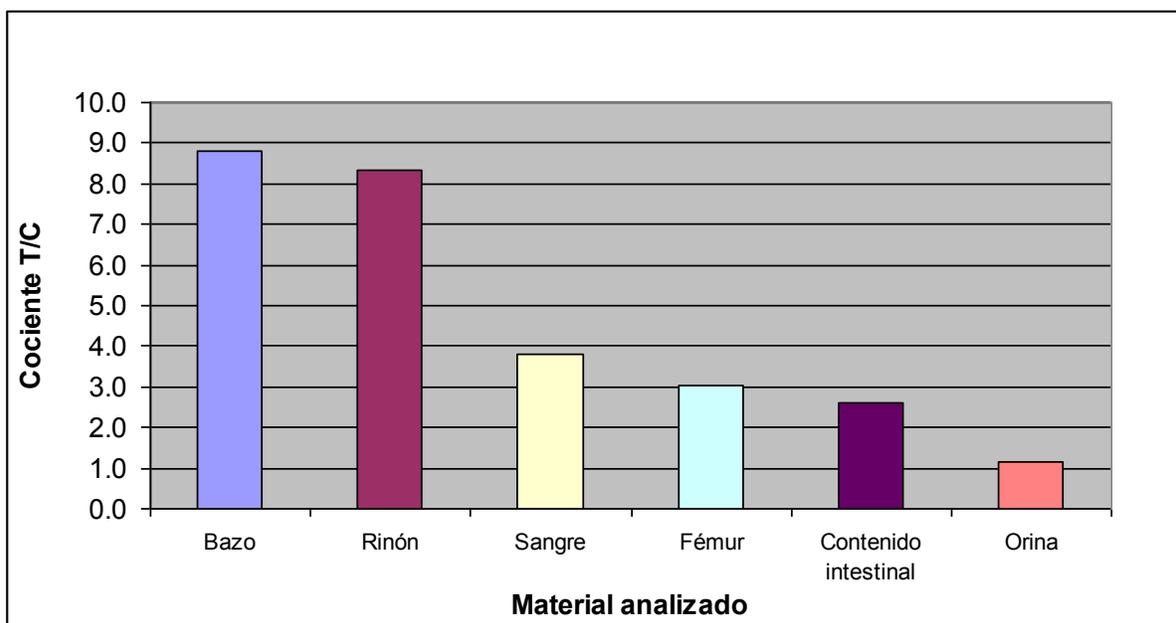
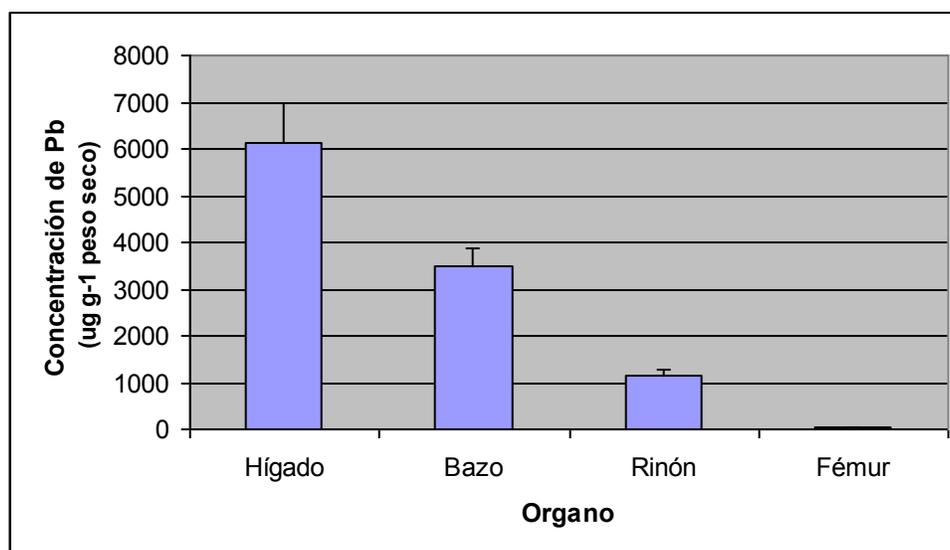


Figura 27. Concentración de plomo en órganos de *Rhinella arenarum* inyectados con dosis subletales del metal durante 5 semanas. Se muestra el valor medido \pm DE en $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco del órgano.



4.1.2- Determinación de parámetros bioquímicos

4.1.2.1- Determinación de la actividad de la δ -ALAD en sangre.

En el grupo de sapos inyectados con plomo (T), se observó una inhibición del 72,8 % en la actividad enzimática media respecto del grupo control (C) (Tabla 15). Estos resultados coinciden con los niveles reportados previamente por nuestro laboratorio, cuyos valores oscilaron entre 66 y 87% (Arrieta et al., 2003).

La diferencia de las medias entre los grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$). La relación (T/C) entre los promedio fue = 0,27.

Tabla 15. Determinación de la actividad de la ALAD en sangre en *Rhinella arenarum* inyectados con plomo y en un grupo control. Los resultados se expresan como media \pm DE.

	Controles	Tratados
Actividad Enzimática (U l ⁻¹ RBC)	138, 0 \pm 23,1 (N=13)	37,5 \pm 5,8 (N=15)

N: n° de individuos.

4.1.2.2- Determinación de la concentración de la Protoporfirina Eritrocitaria Libre (PEL).

En el grupo de tratados (T), se encontró un aumento en el nivel de PEL respecto al grupo control (C) de 8,85 veces (relación T/C) y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,002$) (tabla 16).

Tabla 16. Concentración de PEL en sangre de *Rhinella arenarum* inyectados con plomo y en un grupo control. Los resultados se expresan como media \pm DE

	Controles	Tratados
PEL ($\mu\text{g dl}^{-1}$)	11,7 \pm 1,9 (N=11)	103,6 \pm 22,5 (N=14)

N: n° de individuos.

4.1.2.3- Determinación del hematocrito.

El hematocrito determinado en el grupo de animales tratados con plomo disminuyó un 43% respecto al grupo control (Tabla 17).

Expresado como relación T/C fue 0,57 con $p < 0,001$.

Tabla 17. Hematocrito (Hto) en sangre de *Rhinella arenarum* inyectados con plomo y en un grupo control. Los resultados se expresan como media \pm DE

	Controles	Tratados
Hematocrito (%)	35,7 \pm 2,8 (N=13)	20,3 \pm 2,5 (N=15)

N: n° de individuos.

4.2- Estudios en humanos

4.2.1- Plomo

4.2.1.1- Determinación del nivel sanguíneo (plombemia) y urinario de Plomo (plomburia)

En humanos, se procedió a la medición de la plumbemia en un grupo de trabajadores de la industria de acumuladores de plomo y en un grupo control de la misma localidad que estaban domiciliados en las proximidades de la fábrica. Con estos datos, se calculó la relación T/C, encontrando un incremento de 2,77 veces en el grupo expuesto laboralmente (T) respecto al grupo control (C). Ambos valores resultaron superiores al límite permitido por nuestra ley.

Los valores de plumbemia obtenidos se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Concentración de plomo en sangre obtenida por punción venosa de un grupo de trabajadores de la industria de baterías de auto y de un grupo control de la misma localidad, que habitan en las proximidades de la fábrica

	Plumbemia ($\mu\text{g dl}^{-1}$)	
	Trabajadores	Controles
Media	153,5	55,5
DE	25,0	27,6
CV%	16,3	49,8
N	26	10

La diferencia hallada entre el grupo control y expuesto laboralmente, fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

La concentración media de plomo en orina de 24 hs. En el grupo de trabajadores expuestos laboralmente al metal fue de $267,4 \pm 76,1 \mu\text{g}$ 24 hs. (n=26).

No pudo establecerse comparación de la plumburia entre grupos ya que no fue posible contar con la muestra de orina de 24 hs. del grupo control.

4.2.2- Parámetros bioquímicos

4.2.2.1- Determinación de la actividad de la δ -ALAD en sangre.

Los valores de la actividad de ALAD en sangre de un grupo de individuos (T y C), se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Actividad enzimática de la ALAD en sangre de individuos trabajadores expuestos laboralmente al plomo y en un grupo control.

	ALAD (UI ⁻¹ de GR)	
	Trabajadores	Controles
Media	14,8	34,3
DE	5,8	10,6
CV%	38,8	30,9
N	26	10

La diferencia entre el grupo control y el expuesto laboralmente fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Se observa una disminución en la actividad de ALAD del 57% en el grupo T, respecto al C, considerando los valores medios de ambos grupos. Este resultado es indicador de la inhibición enzimática presente en los trabajadores laboralmente expuestos al plomo.

4.2.2.2- Determinación de la concentración de la Protoporfirina Libre Eritrocitaria (PEL).

Los valores medios de los resultados obtenidos de la medición de PEL en los grupos T y C se muestran en la Tabla 20. En el grupo de individuos expuestos laboralmente se encontró una gran dispersión de valores, mientras que los individuos controles presentaron valores acordes con la bibliografía para individuos normales, donde el nivel de protoporfirinas fue menor de $80 \mu\text{g dl}^{-1}$ GR.

Tabla 20. Concentración de PEL en individuos expuestos laboralmente al plomo y en un grupo control.

	PEL ($\mu\text{g dl}^{-1}$ GR)	
	Trabajadores	Controles
Media	106,1	24,4
DE	72,9	5,3
CV%	68,7	21,5
N	26	10

La diferencia entre el grupo control y el laboralmente expuesto, fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

De la tabla 19, puede observarse un incremento de un 435% del valor medio de PEL en el grupo de trabajadores respecto de los controles.

4.2.2.3- Determinación de la concentración de Hierro sanguíneo.

Los niveles hierro hallados en sangre de los trabajadores y el grupo control se muestran en la Tabla 21. Se observa que el grupo expuesto laboralmente, presentó un valor medio 1,69 veces mayor que el grupo control. Este resultado se corresponde con un estado de sobrecarga de hierro, que puede atribuirse a la falta de su utilización por parte del compartimiento hematopoyético.

Tabla 21. Valores de hierro en suero de individuos expuestos laboralmente al plomo y de un grupo control.

	Ferremia ($\mu\text{g dl}^{-1}$)	
	Trabajadores	Controles
Media	150,5	86,1
DE	42,7	20,3
CV%	28,4	23,5
n	26	10

Se encontró que la diferencia de los valores medios entre grupos fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

Se realizaron análisis de regresión entre la ferremia y los parámetros biosensores de exposición y efecto, δ -ALA-D y PLE, no encontrándose significancia estadística en las correlaciones ($p = 0,518$ y $0,813$ respectivamente). Del mismo, tampoco se encontró significancia en la correlación con la plumbemia ($p=0,907$).

4.2.3- Estudio Hematológico

En la intoxicación por plomo se espera encontrar una anemia normocítica y normocrómica que puede evolucionar a microcítica e hipocrómica con la cronicidad de la patología. Con el fin de estudiar en la intoxicación por plomo, los parámetros que se incluyen dentro del estudio hematológico, se informan en la Tabla 22.

Tabla 22. Resultados del estudio hematológico para el grupo de trabajadores expuestos laboralmente al plomo y el grupo de individuos control, expresados como valor medio \pm DE.

	RGB ($\times 10^9/l$)	RGR ($\times 10^{12}/l$)	Hb (g/dl)	Hto (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	ADE (%)	PLT ($\times 10^9/l$)
Trabajadores	8.1 $\pm 2,1$	4.9 $\pm 0,3$	14.3 $\pm 0,6$	44.1 $\pm 3,0$	89.9 $\pm 3,4$	29.5 $\pm 1,4$	32.5 $\pm 1,2$	13.0 $\pm 0,8$	217.0 $\pm 37,0$
Controles	8.7 $\pm 1,8$	5.4 $\pm 0,6$	15.2 $\pm 1,4$	45.7 $\pm 3,4$	85.1 $\pm 9,9$	28.4 $\pm 3,7$	33.3 $\pm 0,9$	13.3 $\pm 0,91$	220.6 $\pm 18,6$
T/C	0,92	0,91	0,94	0,97	1,06	1,03	0,97	0,98	0,98
p-valor	0,179	0,021*	0,064	0,206	0,131	0,212	0,118	0,872	0,714

Nota: los valores p se calcularon por el test de Student, para un intervalo de confianza del 95%. *= se observó significancia estadística.

Se encontraron leves diferencias (T/C) entre los valores promedio de los trabajadores expuestos laboralmente y el grupo control, como puede observarse en la Tabla 22; estas diferencias no resultan clínicamente significativas. Todos los analitos estudiados en el hemograma son normales, sin embargo, se observa una disminución en el número de GB y en los parámetros relacionados a la anemia (RGR, Hb y Hto) en el grupo de trabajadores. Se analizó la significancia estadística de las diferencias entre grupos, obteniendo significancia estadística ($p < 0,05$) únicamente para RGR.

La relación promedio trabajadores/promedio referencia (Dacie y Lewis, 2006), osciló entre 0,79 y 1,14 (Tabla 23), lo que se interpretó como una indicación de que en los trabajadores expuestos los parámetros determinados se hallaban en un nivel similar al de los datos bibliográficos en individuos de referencia (Ventimiglia et al, 2003).

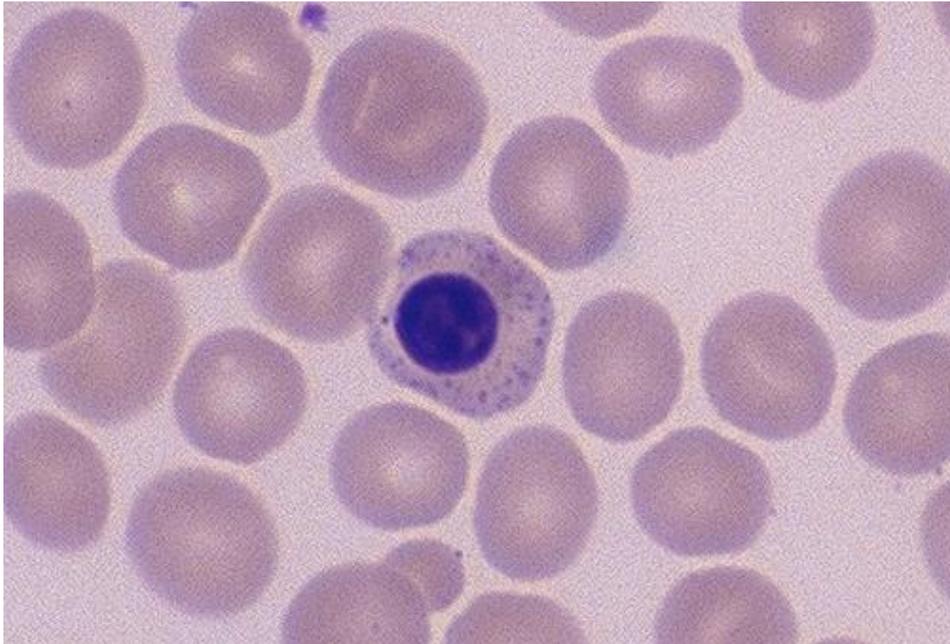
Tabla 23. Relación promedio trabajadores/valor promedio en individuos de referencia (según Dacie Lewis).

	RGB x10 ⁹ /l	RGR x10 ¹² /l	Hb(g/dl)	Ht(%)	VCM(fl)	HCM(pg)	CHCM(%)	ADE(%)	PLTx10 ⁹ /l
T	8,0	4,9	14,4	44	90	29	32	13	217
N	7,0	5,0	15,0	45	92	30	33	12,8	275
T/N	1,14	0,99	0,96	0,99	0,98	0,99	0,98	1,02	0,79

4.2.3.1- Examen microscópico del Frotis sanguíneo

Uno de los hallazgos característicos en la intoxicación con plomo es el punteado basófilo presente en los hematíes (Carr y Rodak, 1999). El plomo interviene en la inhibición de la enzima pirimidín- 5' nucleotidasa. Cuando esta deficiencia enzimática es suficientemente severa, se favorece que los 5' piridín- nucleótidos provenientes de los ribosomas no degradados, se agregan (Rodak, 2005) conformando estructuras puntiformes (Figura 28), que pueden visualizarse con la tinción de May Grunwald- Giemsa (Valentine, 1974).

Figura 28. Eritroblasto ortocromático en sangre periférica en el cual puede apreciarse punteado basófilo. Tinción de May Grunwald-Giemsa (100X).



Otro efecto de la intoxicación con plomo es la hemólisis prematura de los eritrocitos, debido a la sumatoria de las inhibiciones enzimáticas como las mencionadas anteriormente. Paglia et al. (1975) establecieron una comparación con la deficiencia hereditaria de la enzima pirimidín 5' nucleotidasa.

En frotis obtenidos a partir de sangre entera sin anticoagular, obtenida por flebotomía de trabajadores y controles, se buscó la presencia de punteado basófilo, siendo en todos los casos negativo.

El plomo provoca una anemia normocítica y normocrómica que en forma crónica puede evolucionar a microcítica y ligeramente hipocrómica, hecho que no se apreció en el grupo de trabajadores, siendo la morfología sanguínea en ambos grupos normal. Como se mencionó anteriormente, se encontró una disminución estadísticamente significativa en el RGR para el grupo de trabajadores, evidenciando un efecto del plomo sobre la eritropoyesis, si bien esto no se pudo comprobar por microscopía.

4.3- Modelo de distribución de plomo

Como se mencionó en el Capítulo de Materiales y Métodos, se administraron inyecciones semanales de soluciones acuosas de acetato de plomo de 50 mg Pb kg⁻¹ de peso corporal durante 5 semanas. Cada dosis, fue de aproximadamente el 6% de la LD50. El grupo control, recibió dosis equivalentes de acetato de sodio.

Plomo total inyectado al cabo de los 35 días, fue = 250 mg Pb kg⁻¹ de peso corporal (Tabla 24). Considerando que el peso promedio de los sapos fue 130 grs., entonces el plomo total medio administrado por animal fue: 32,5 mg de plomo totales.

Tabla 24. Equivalencias entre la cantidad real inyectada semanal y total respecto de la dosis diaria calculada.

Diaria	Semanal	Total (35 días)
7142,9 µg Pb kg ⁻¹	50000 µg Pb kg ⁻¹	250000 µg Pb kg ⁻¹
928,6 µg Pb kg ⁻¹ /animal	6500 µg Pb kg ⁻¹ /animal	32500 µg Pb kg ⁻¹ /animal

Entonces la dosis calculada por día y por animal fue: 928,57 µg

Con los supuestos del modelo considerado mencionados anteriormente, se calculó el nivel de plomo en órganos en los controles. La diferencia T-C es la acumulación de plomo en los diferentes órganos, en los 42 días que duró la experiencia (tabla 25).

Tabla 25. Acumulación de plomo en órganos de animales tratados con plomo respecto a los controles. Los resultados se expresan en µg Pb

Órgano	Tratado (Tf)	Controles (To)	Diferencia T-C (acumulación o contenido de Pb)	T/C
Hígado	6995,1	15,9	6979,2	439,9
Riñón	156,4	6,5	149,9	24,1
Bazo	74,8	8,3	66,5	9,0
Fémur	25,5	7,7	17,8	3,3

Se definió la ganancia de plomo (acumulación) como la diferencia entre el contenido en órganos de individuos tratados respecto de los controles por día de experiencia y para cada órgano (Tabla 26): dCPb/t total y dCPb/día.

Se calculó la ganancia diaria, dividiendo la acumulación de plomo en órganos por los días que duró el experimento (42 días).

Tabla 26. Ganancia o acumulación de plomo diario en diferentes órganos de individuos de *Rhinella arenarum*, calculado a partir del contenido total del metal.

Órgano	Contenido de Pb en órganos (µg Pb)	Ganancia diaria (µg Pb)
Hígado	6979,2	166,2
Riñón	149,9	3,6
Bazo	66,5	1,6
Fémur	17,8	0,4

Discusión y conclusiones

5.1- Estudios en el modelo animal

5.1.1 Determinación del nivel sanguíneo basal

La declinación en el número de anfibios que está ocurriendo en todo el mundo (Boyer, 1995), tiene que ver con la destrucción de sus hábitats y la sobreexplotación de los terrenos para cultivo (Palavecino y García, 2008). También se han reportado recientemente casos de parasitosis en *Rhinella arenarum* (Gonzalez Rivas et al., 2012) y de la presencia de tóxicos (herbicidas como el glifosfato e insecticidas piretroides como cipermetrina) que afectan negativamente a la población anfibia (Brodeur, 2010; Ronco, 2010; Sotomayor, 2011). Los efectos de la presencia de los tóxicos metálicos en el ambiente han sido bien documentados, como ejemplo los alteraciones teratogénicas en diferentes estadios embrionarios de *R. arenarum* (Sztrum, 2010).

La presencia de plomo en los sapos puede explicar en parte este hallazgo, aunque se debe aclarar que considerar la existencia de un único tóxico en el ambiente es una simplificación (Rowe et al., 2001).

Los niveles de plomo hallados en sangre de *Rhinella arenarum* inmediatamente arribados al laboratorio, sin haber recibido ningún tratamiento previo, dan cuenta por un lado, de la presencia y permanencia del plomo en el ambiente (Fink y Salibián, 2005), y en segundo lugar, de la biodisponibilidad de este elemento, su incorporación a la biota y del riesgo que significa para la vida silvestre (Buekers et al., 2009).

El hecho observado de que el nivel de plomo sanguíneo medido se haya mantenido estable en todos los muestreos realizados durante casi 3 años, refleja la permanencia constante del plomo en el ambiente. Los niveles más bajos de plomo se midieron en los meses de otoño, cuyas diferencias respecto del promedio total de los muestreos fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Este hallazgo, se corresponde con el comienzo de las estaciones de bajas temperaturas, coincidente con la reducción en la actividad metabólica en los anfibios *Hypsiboas pulchellus* y *Dendropsophus nanus*, como ha sido documentado recientemente (Antoniuzzi et al., 2012). Es importante destacar que, se ha reportado en anfibios (*R. fernandezae*) una variación estacional del recuento de eritrocitos, encontrándose en otoño los menores recuentos de hematíes (Cabagna Zenklusen et al., 2011). Dado que el plomo es transportado en la sangre, en su mayor proporción, dentro de los hematíes (Buerkers et al., 2009), esta disminución estacional de glóbulos rojos podría explicar nuestros resultados.

La plumbemia, es afectada también por el tiempo de vida media de los glóbulos rojos. Mientras que la vida media de los eritrocitos en humanos es de 120 días, en anfibios es de 300 a 1400 días y en otros grupos de vertebrados como las aves, reptiles y peces es de 40, 600-800 y 80-500 días respectivamente (Morera y MacKenzie, 2011). Las altas tasas de recambio metabólico de las aves en general corresponden a una pequeña población de los glóbulos rojos totales, por lo que puede asumirse que se llega rápidamente a un nuevo equilibrio en la concentración de plomo en sangre (Buekers et al., 2009). El tiempo de vida media de los hematíes de anfibios, indicaría que este factor no afectaría el nivel de plomo medido en los sapos recién arribados a nuestro laboratorio, como tampoco en las experiencias que se realizaron posteriormente.

Por otro lado, el nivel de plomo en sangre refiere una exposición reciente del individuo tanto en humanos como en animales (Rabinowitz et al., 1976; Tsaih et al., 2004; Buekers et al., 2009) y está en relación a otros compartimientos como el de los tejidos blandos y el sistema esquelético (Rabinowitz et al., 1985); este último refleja la acumulación del metal debido a una exposición en forma crónica (Rosin, 2009), pudiendo llegar a ser una fuente endógena de exposición en individuos con aumento en la velocidad de remodelación ósea (Tsaih et al., 2004). Por esta razón, se reportó en humanos que el plomo en hueso es mejor predictor que la plumbemia en algunos efectos sobre la salud (ATSDR, 2007). La acumulación del metal en hueso (fémur) de *Rana catesbeiana*, fue documentada por Niethammer et al. (1985) y en *Rana clamitans* por Stansley y Roscoe (1995).

El nivel basal promedio de plomo en sangre de *Rhinella arenarum* medido (3.33 mg dl^{-1} , $n=152$) fue reportado en forma preliminar por nuestro laboratorio (Arrieta et al. 2001). Estos valores hallados, fueron superiores a los niveles publicados por Buekers et al. (2009) para diferentes especies de mamíferos de $0,001$ a $0,07 \text{ mg dl}^{-1}$, para las cuales el nivel de seguridad es $0,035 \text{ mg dl}^{-1}$ (Ma, 1996) y para distintas especies de aves acuáticas se encontraron valores desde $0,001$ a $0,023 \text{ mg dl}^{-1}$ y los valores para el diagnóstico de intoxicación $0,050$ - $0,100 \text{ mg dl}^{-1}$ (Pain, 1996). A la fecha, no tenemos referencias de que se hayan propuesto específicamente para anfibios, niveles equivalentes a los de diagnóstico en humanos. Los niveles más altos de plomo en sangre de *R. arenarum* encontrados en nuestro trabajo son un indicador de la resistencia de esta especie a este tóxico ambiental, hecho que se demostró en los experimentos de DL50.

Al realizar el cálculo del índice de contenido de plomo (ICP), considerando el nivel de plomo sanguíneo (promedio: $2,52 \pm 0,53 \text{ mg dl}^{-1} \text{ g}^{-1}$) dividido el peso promedio de los animales, se obtuvo una expresión que considera el aspecto fisiológico del aumento del tamaño del individuo con la edad (Sztrum, 2010). La variabilidad fue mayor en ICP (20,8%) indicando una mayor sensibilidad para detectar cambios, que la expresión de la plombemia media en cada uno de los muestreos (2,7%).

Durante el segundo muestreo, a los 13 y 26 días de la primera extracción, se obtuvieron 2 muestras adicionales de sangre de los sapos capturados. Los resultados demostraron que no existió una variación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en los valores de plombemia debido al manipuleo de los individuos en las condiciones del laboratorio, aclimatación y mantenimiento como lo demostraron Arrieta et al. (2001).

5.1.2-Plomo en el Suelo

La contaminación ambiental generada por actividades mineras o fundiciones de plomo, hacen que el metal difunda en el ambiente y afecte a los vertebrados a través de la cadena alimentaria o por ingestión de sedimentos (Buekers et al., 2009). De forma similar, se encontró en pequeños mamíferos que viven en suelos contaminados por fundiciones de plomo, el aumento del peso de órganos como el riñón y la disminución del hematocrito (Rogival et al., 2006). La fauna puede ingerir suelo contaminado inadvertidamente cuando se alimenta, y esta puede ser una vía de exposición a los tóxicos ambientales (Stanley y Roscoe, 1996). Beyer et al. (1994) sugirieron que este mecanismo es de importancia en ranas. Dado que en el presente trabajo, se consideró como objeto de estudio a un anfibio adulto, para la obtención del modelo animal la medición del nivel de plomo en suelo fue de relevancia.

Los resultados obtenidos en este trabajo, apoyan fuertemente la importancia de la contaminación ambiental con plomo, expresada por los altos niveles detectados en los alrededores de la ciudad de La Plata, y así también, hablan de la persistencia de dicho metal en el ecosistema, debido a que no sufre ningún tipo de degradación (Ronco et al, 1992). En ese sentido, Camilion et al. (1996), hallaron en una zona de estudio coincidente con la nuestra, es decir de las proximidades de las rutas y principales vías de tránsito de la ciudad de La Plata, concentraciones de plomo entre 140 y 211 mg kg^{-1} (valor medio 175,5), comparadas a 16 mg kg^{-1} (11 veces menor) encontradas en áreas no contaminadas. Estos resultados, están de

acuerdo con los hallados por nuestro laboratorio en la misma área estudiada: 105,8 y 106,4 mg kg⁻¹ en los lechos de rutas (valor medio 106,1) y 24.1 mg kg⁻¹ en las zonas alejadas del tránsito (4,4 veces menor)). De igual modo, Saint-Lauren et al. (2010) detectaron concentraciones de plomo de hasta 149,13 mg kg⁻¹ en la rivera de dos de los principales ríos de Quebec, Canadá, mientras que en áreas agrícolas consideradas no contaminadas, las concentraciones del metal estuvieron en el rango de 12 a 22 mg kg⁻¹, que coincide con nuestras observaciones.

La presencia de plomo en el suelo, puede deberse a varias fuentes, pero la principal contribución fue su uso como aditivo en las naftas, y es por esto que se pueden encontrar altos niveles del metal cerca de las principales vías de tránsito (ATSDR, 2007). Recientemente, Deocampo et al (2012) encontraron en áreas urbanas de Atlanta (GA, EEUU) próximos al centro de la ciudad, concentraciones medias de Pb de 63 mg kg⁻¹ con valores máximos de hasta 278 mg kg⁻¹, comparado con valores medios en áreas residenciales cercanas, dentro del casco urbano, de 93 mg kg⁻¹ y máximos de 972 mg kg⁻¹. Estos datos, mucho más altos que los hallados en nuestro trabajo, son muy relevantes porque se trata de un trabajo reciente en un país que limitó el uso del Pb como aditivo de las naftas ya desde 1995 (Smith, 2000), y que ha implementado en forma permanente programas de control de medio ambiente, como la prohibición del uso de municiones con plomo desde 1991 (Anderson, 1992).

5.1.3- Determinación de las dosis letales de plomo y estudio del efecto de la temperatura

La toxicidad del plomo depende de varios factores: pueden existir diferencias inherentes a la especie de anfibio, y también del estadio de desarrollo, siendo las larvas más sensibles que los adultos (Mouchet et al., 2007). Por tal motivo, se eligió a los ejemplares adultos de *Rhinella arenarum* como objeto de estudio.

Se halló que el efecto tóxico del metal en los sapos fue dependiente de la temperatura, como lo demuestra la marcada caída de la supervivencia de los sapos a 28,5°C en las experiencias de DL50. La supervivencia disminuyó notablemente a partir de la inyección de una dosis de 800 mg l⁻¹ de acetato de plomo a 20°C, mientras que a mayor temperatura (28,5°C), la DL50 fue menor, observando un aumento de mortandad desde 600 mg l⁻¹.

En las experiencias realizadas a 20°C, se observó una disminución de la supervivencia de la población de hasta 60 % a partir de 800 mg l⁻¹. Estos efectos fueron dependientes del tiempo de exposición, así se observó a esta concentración que a las 48 hs había una disminución del 20% en la supervivencia. La DL50 hallada a esta temperatura fue 908 mg l⁻¹. En las experiencias a 28,5°C, los efectos tóxicos del plomo fueron más acentuados. Se encontró que a partir de las 48 hs, hubo una supervivencia de la población del 80% a 600 mg l⁻¹, mientras que a concentraciones mayores, a las 24 hs, la supervivencia de la población descendió al 40%. La DL50 hallada a esta temperatura fue 617 mg l⁻¹.

Las DL50 coinciden con las halladas por Arrieta et al. (2000), 931 y 724 mg l⁻¹ a 20 y 28,5°C, respectivamente. Hubo una ampliación de la experiencia, aumentando el número de determinaciones, y se observó una disminución no significativa (Test de Mann-Whitney, p>0,05) de los valores de DL50 a ambas temperaturas. No se han encontrado otros trabajos en los que se evalúe el efecto de la temperatura sobre la DL50 en *Rhinella arenarum*.

En otros animales, se encuentran ejemplos de especies de mayor o menor sensibilidad al plomo que *Rhinella arenarum*. Entre las primeras, Camacho Sánchez y Gamboa Delgado (2003), encontraron que la DL50 para estadios larvarios de *Macrobrachium rosenbergii* (langostino malayo) luego de una incubación de 48 hs. con acetato de plomo, fue 0,2 (0,08-0,7) mg l⁻¹. En cambio, Vázquez (2005) encontró en larvas del cangrejo *Chasmagnathus granulatus*, luego de incubar 12, 48, 72 y 96 hs con (NO₃)₂Pb, que las DL50 fueron respectivamente: 8,927; 7,246; 3,207; 2,936 mg l⁻¹ respectivamente.

Con las DL50 obtenidas, se pudo comprobar que los sapos adultos resultaron ser adecuados para estudios toxicológicos, dada su resistencia al plomo y adaptación a las condiciones de laboratorio. Por lo tanto, representan un excelente modelo para estudios de contaminación (ecotoxicológicos) por el metal (Fink y Salibián, 2005).

5.1.4- Distribución compartimental del plomo en el sistema sanguíneo de *Rhinella arenarum*

Se sabe que, el plomo, luego de ser absorbido, es transportado por la sangre hacia los sitios de acumulación o almacenamiento. Existe una concentración diferencial entre los diferentes compartimientos del sistema

sanguíneo; la mayor proporción del plomo es transportado en los glóbulos rojos, uniéndose a proteínas intracelulares ricas en grupos sulfhidrilos (Buekers et al., 2009).

En los experimentos de distribución realizados en sapos, se demostró que en el compartimiento sanguíneo, el sitio principal de localización de plomo es el paquete globular, encontrando el 60% (dosis de 100 ppm) y el 67% (dosis de 600 ppm) del metal inyectado a 20°C, y 69% (dosis de 100 ppm) y 71% (dosis de 600 ppm) a 28,5°C. Estos hallazgos pueden interpretarse estimando que se alcanza una saturación de aproximadamente el 70%, siendo más evidente a 28,5°C.

No se han encontrado estudios similares en *Rhinella arenarum*. Al comparar estos resultados con los trabajos en mamíferos, resulta evidente que el porcentaje de plomo transportado en hematíes de estos últimos es muy superior. Para evaluar correctamente estas diferencias, hay que considerar que los hematíes de los sapos son nucleados, mientras que los de mamíferos se han especializado, para tener la mejor relación del contenido hemoglobínico en el volumen celular. El área del núcleo de hematíes de los anuros (*Rhinella fernandezae*) representa el 15% del área celular total (Cabagna Zenklusen et al., 2011)

En humanos, se ha observado que aproximadamente entre el 40 y el 75% del plomo que circula en el plasma está ligado a proteínas, en especial a albúmina; el resto no unido a proteínas, lo hace a compuestos azufrados de bajo peso molecular como homocisteína o cisteína (Al- Modhefer et al., 1991). En nuestros experimentos, el plomo medido en plasma en las experiencias de distribución a 20°C, representó el 39% (dosis de 100 ppm) y 32% (dosis de 600ppm) y a 28,5°C el 30% (dosis de 100 ppm) y 28% (dosis de 600 ppm). Este hallazgo se corresponde con el aumento de concentración dentro de los GR, por el efecto de la temperatura. Nuestros resultados pueden explicarse, considerando la existencia de una proteína intracelular de alta afinidad al plomo. Bergdahl et al. (1997), demostraron por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, que el plomo se encontraba principalmente unido a una proteína de 240 kDa, que revelada mediante anticuerpos específicos, resultó ser ALAD.

El grupo de sapos tratados a 28,5°C tuvo una supervivencia menor que el grupo control, probablemente debido a un mayor efecto tóxico del metal, ya que la dosis utilizada en la experiencia (600 ppm) fue próxima a la DL50 a esa temperatura (617 ppm). En ambas temperaturas estudiadas (20 y 28,5 °C), la supervivencia para la concentración de plomo de 100 ppm (lejana a la DL50), fue del 100 % en ambos grupos de sapos.

Para el estudio del transporte del plomo en la sangre, se analizaron las regresiones entre las medidas de plomo en sangre entera, paquete globular, plasma y suma de fracciones, como se muestra en las figuras 20-24, del capítulo de resultados. Las únicas correlaciones positivas fueron en el grupo de sapos tratado con 600 ppm y a 20°C (ya que a 28,5°C no hubo sobrevivientes suficientes), entre la sangre entera y la suma de fracciones, y entre la sangre entera y el paquete globular. Estos resultados hablan de la importancia de tolerancia a la dosis, ya que a 100 ppm estos efectos no se observaron.

5.1.5- Efectos adversos del plomo sobre parámetros bioquímicos

La actividad de la ALAD, correlacionó inversamente con la concentración de plomo en sangre, con lo cual resultó inhibida en los sapos tratados con acetato de plomo, en un 72,8%, respecto del grupo control ($P < 0.001$). Estos resultados coinciden con los hallados en nuestro laboratorio (Arrieta et al, 2000b), donde se reportó previamente, una inhibición de ALAD del 74 % en la misma especie de sapos. En otras especies, como *Rana clamitans*, la enzima se encontró inhibida en 73-86% con respecto a un grupo control (Stanley y Roscoe, 1996). Recientemente Ilizaliturre-Hernández et al. (2012) encontraron una inhibición de ALAD de *R. marina*, del 78% en una zona industrial de una ciudad del estado de Veracruz, Méjico.

La concentración de PEL correlaciona positivamente con la plumbemia y se encontró que en el grupo de sapos tratado con el metal, este valor aumentó significativamente ($p < 0.002$) hallándose 8,85 veces superior respecto al grupo control.

Se concluye que en sapos inyectados con dosis subletales de plomo, la actividad de la ALAD y la concentración de PEL, fueron los marcadores más sensibles de exposición al plomo.

5.1.6- Aspectos adversos del plomo sobre el sistema hematopoyético

Entre los parámetros hemáticos estudiados, el hematocrito, disminuyó en un 43% en el grupo de animales tratados con plomo (con inyecciones semanales de acetato de Pb, 50 mgPb kg⁻¹, durante 5 semanas), respecto de los individuos control. Estos resultados, fueron estadísticamente significativos ($p < 0.001$), y coincidentes con la disminución del 57% en este valor, encontrada por nuestro laboratorio (Arrieta et al, 2004). Estos

hallazgos, se pueden explicar por el efecto inhibitorio del metal sobre la eritropoyesis. Así, Grue et al (1986) estudiaron el efecto del plomo sobre los estorninos europeos (*Stornus vulgaris*) de vida libre, encontrando disminución del 10% en el Hto de los animales que habitaban zonas contaminadas con plomo, respecto a grupos que habitaban zonas control, libres del metal.

En otra serie de estudios previos, se demostró que la administración del metal en un corto período de tiempo (dosis única de AcPb), no provocaba cambios significantes en el hematocrito (Arrieta et al 2000; Perí et al 1998b; Rosemberg et al, 1998). Ireland (1977) obtuvo resultados coincidentes con éstos en *Xenopus leavis* adultos, evaluando hemoglobina, hematocrito y reticulocitos, los cuales no presentaron cambios significativos, con excepción de la actividad de la δ -ALAD que tuvo cambios con significancia estadística.

5.1.7-Distribución y acumulación de metal en los órganos blanco

La distribución del plomo en los diferentes tejidos de *Rhinella arenarum* no fue homogénea. Se determinó la concentración de plomo en los órganos blanco (hígado, bazo, riñón, sangre, hueso) y el contenido total del metal acumulado en éstos. También se evaluó la cantidad de plomo eliminada en orina y heces.

Comparando el contenido de plomo en los órganos (peso seco), se concluyó que el hígado fue el que exhibió la mayor concentración, 382 veces más elevada que en los individuos control. Esta acumulación diferencial de plomo en hígado, coincide con lo reportado por Lee y Stuebing (1990) en *Rhinella yuxtastaper*. También se han encontrado trabajos en otras especies: Ireland (1977) informó sobre el mayor depósito de plomo en los tejidos blandos del sapo *Xenopus leavis*; Wayland et al. (1999) utilizaron la concentración de plomo en hígado para determinar el envenenamiento y exposición al metal en águilas calvas (*Haliaeetus leucocephalus*) y doradas (*Aquila chrysaetos*) de Canadá; Kruse y Krüger (1986) consideraron al hígado como el órgano de mayor acumulación de plomo en peces; Sures et al. (1994) encontraron los mayores niveles de plomo en hígado provenientes de anguilas (*Anguilla anguilla*) en Alemania y en uno de sus parásitos, el nematode *Paratenuisentis ambiguus*, una concentración 20 veces superior al hígado de su huésped.

Otros órganos blanco estudiados fueron: riñón, bazo, sangre y el tejido óseo (fémur), en los cuales las concentraciones encontradas fueron inferiores a hígado. Wayland et al. (1999) encontraron las mayores concentraciones de plomo en hígado ($6-243 \mu\text{g g}^{-1}$) y riñón de águilas, con una fuerte asociación log-lineal entre ellas ($R^2=0,87$; $p<0,001$); la concentración del metal en el tejido óseo ($2,7-17,6 \mu\text{g g}^{-1}$), resultó baja en esta especie respecto de otras aves rapaces, lo que puede sugerir una alta susceptibilidad de las águilas a los efectos tóxicos del plomo. Estos autores sugieren que la medición de plomo en hígado y riñón de estos animales podrían incrementar la probabilidad de identificar casos de envenenamiento por el metal.

La distribución de plomo hallada está vinculada a la duración de las experiencias realizadas y a las dosis subletales utilizadas (Ventimiglia et al., 2009). En la exposición aguda, los órganos blandos fueron quienes recibieron la mayor concentración, mientras que el tejido óseo tiene un importante rol en el secuestro del metal en la intoxicación crónica, siendo un importante mecanismo de detoxificación (Wayland et al. 1999).

El plomo medido en la orina de los sapos control, sugiere de la importancia que tiene esta vía en la eliminación del metal, sin embargo en los animales tratados no se encontró un aumento marcado. Este hecho podría explicar la acumulación del plomo hallada en tejidos y órganos, especialmente sobre la selectividad de la misma.

Se encontró que el plomo induce un marcado aumento en el peso seco del órgano en hígado, riñón y bazo, mientras que en fémur dicho efecto no fue significativo, como fue publicado preliminarmente por nuestro laboratorio (Arrieta et al., 2004). Una posible explicación es que el tiempo de los experimentos no resultó ser suficiente para detectar el proceso de acumulación en hueso. Hay que considerar también que la acumulación que ocurre en la intoxicación plúmbica, va acompañada de procesos degenerativos (Braunbeck, 1998; Williams y Iatropoulos, 2002) especialmente en el tracto digestivo de los anfibios como observaron Rice et al. (2002).

5.2- Estudios en Humanos

Los individuos que están expuestos laboralmente, tienen un riesgo aumentado de sufrir las consecuencias del saturnismo, ya que la exposición repetida al plomo puede llevar a la intoxicación por este metal. Este problema ha sido conocido por lo menos hace un siglo (Needleman, 1995). En este caso, se seleccionó una población de trabajadores de la industria de baterías de automóvil, y como grupo control, habitantes de la misma localidad.

Los parámetros utilizados como biosensores de exposición en individuos laboralmente expuestos, fueron la plumbemia y la plumburia. Como parámetros bioquímicos de efecto, se midió la actividad de la δ -ALA-D y también PEL, descartando patologías hemáticas tales como la anemia por deficiencia de hierro (anemia microcítica e hipocrómica), mediante la realización de estudios hematológicos complementarios y el examen microscópico del extendido sanguíneo.

La anemia por déficit de hierro provoca el aumento de PEL (Piomelli, 2003) al igual que la anemia hemolítica tóxica originada por el plomo, D594, (OPS/OMS 2010).

También, se midió la ferremia, para evaluar alteraciones en el metabolismo del hierro en relación a la intoxicación por plomo, proponiendo la utilización de este último parámetro como biosensor de exposición al plomo (Ventimiglia et al., 2006).

Los resultados obtenidos en la medida de plomo en sangre, del grupo de trabajadores, y del grupo control, se contrastaron contra datos de la literatura regional; para el grupo de trabajadores, el valor límite aceptable es $30 \mu\text{g dl}^{-1}$ (Fernandez et al., 2003; Albiano, 2011) y se los debe apartar de la fuente de intoxicación cuando la plumbemia es $50 \mu\text{g dl}^{-1}$ (ACGIH, 2004). Sin embargo, los valores encontrados en el grupo de trabajadores fueron muy superiores: el valor medio fue 5 veces mayor que el nivel superior máximo aceptable (valor medio = $153,5 \pm 25,0 \mu\text{g dl}^{-1}$).

Es de destacar que, durante la visita a la fábrica, se comprobó la falta de elementos de protección personal en los trabajadores y un depósito muy abundante de polvo gris del metal, esparcido por todos los ambientes de producción. Se observó, en uno de los trabajadores, alteraciones del sistema nervioso, tales como temblores y problemas en la escritura. En este sentido, luego del muestreo realizado, la Secretaría de Política Ambiental de la

Provincia de Buenos Aires, en la Resolución n° 353/04, convalidó la clausura preventiva total del establecimiento por haber constatado “el grave peligro de daño inminente sobre la salud de los trabajadores, la población y/o el medio ambiente “ con lo que la fábrica fue multada y cerrada al encontrarse “efluentes que desembocaban en una zanja que conduce a suelo natural sin tratamiento alguno, con evidencias de vegetación quemada por sustancias agresivas para el ambiente”, habiendo constatado mediante muestreo, “parámetros que superaban los máximos legalmente permitidos.” Así también, fue elevado el nivel de la plumbemia en el grupo control respecto al grupo de trabajadores, siendo 2,8 veces menor (valor medio = $55,5 \pm 27,6 \mu\text{g dl}^{-1}$), lo que representa 1,85 veces superior al límite de exposición en adultos ($30 \mu\text{g dl}^{-1}$) y 1,11 veces superior al nivel de plomo en sangre que es considerado límite máximo de exposición laboral en adultos (ACGIH, 2004). Este hallazgo se explica por tratarse de una población pequeña (17364 hab.; INDEC 2010) y que habitaban en las proximidades de la fábrica (escasos metros de distancia), por lo que se relacionó a la contaminación ambiental por el metal. Es de destacar que en EEUU han recomendado recientemente la reducción del valor de plomo en sangre en adultos a menor de $10 \mu\text{g dl}^{-1}$ (DHHS, 2010).

En otro estudio realizado en individuos no expuestos laboralmente el plomo, de la zona de La Plata y Berisso, De Cristófano y Gianuzzi (2002), encontraron valores inferiores a $15 \mu\text{g dl}^{-1}$. En un estudio previo de los mismos autores, habían informado un valor promedio de $10,9 \mu\text{g dl}^{-1}$ para habitantes de La Plata (n=179) y $11,8 \mu\text{g dl}^{-1}$ para los habitantes de Berisso (n=30). Di Salvo et al. (2009) midieron la plumbemia en niños con edades comprendidas entre 6 meses y 5 años, que asistieron a consultorios externos del Htal. De niños Sor Ludovica de la ciudad de La Plata, obteniendo un valor medio (media geométrica) de $4,26 \mu\text{g dl}^{-1}$ (IC del 95%: 3,6-5,03).

En todos los trabajos locales consultados, los valores reportados son claramente menores de los encontrados en nuestra población control, y esto puede explicarse por la vecindad de estos individuos con la fábrica de acumuladores. Si bien el grupo control, no estuvo expuesto laboralmente, pudo haber sido alcanzado por la contaminación ambiental. En el agua de bebida de esta población, se encontró que el nivel de plomo era de $1000 \mu\text{g l}^{-1}$, mientras el límite aceptable es de $50 \mu\text{g l}^{-1}$, según la OMS y nuestra ley 24051/93, es decir 20 veces superior, lo cual sugiere una importante contaminación de las napas de agua potable y a la vez, la importancia de la realización del monitoreo ambiental para el cuidado de la población vecina a la fábrica.

Los valores encontrados en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y alrededores por López et al. (2005), en población sana no expuesta laboralmente y de sexo masculino, fueron: 3,06-17,67 $\mu\text{g dl}^{-1}$ (n = 119), bajos comparados con los niveles (33-50 $\mu\text{g dl}^{-1}$) reportados en estudios previos realizados por García Fernández et al. (1984) y esto fue interpretado como el efecto beneficioso debido a la prohibición del metal como aditivo en las naftas, desde el año 1996 y al reemplazo de las soldaduras de plomo en las latas de conservas por procedimientos eléctricos más inocuos.

Se encontró una gran disparidad de resultados e incluso en la forma de expresión de resultados en diferentes trabajos científicos (Tabla 27).

Tabla 27. Niveles de plomo en sangre en humanos reportado en diferentes fuentes bibliográficas. Puede observarse la gran disparidad de expresión de unidades en los distintos trabajos científicos.

Autor	Año	Población	lugar	Nivel de plomo
Durlach et al.	1986	Individuo con ingesta de perdigones de plomo alojados en el apéndice	Alaska	67,4 $\mu\text{g/dl}$ (674 $\mu\text{g/l}$)
Hansen et al.	1999	172 niños	Córdoba, Argentina	7,7 +/-1.1 $\mu\text{g/dl}$
Aranguren Zuleta et al.	2003	21 Trabajadores de estaciones de servicio	Trujillo, Venezuela	172,1 mg/l
Martínez Riera et al.	2003	133 Niños expuestos a una fundición	Tucumán, Argentina	22,9 (10-45) $\mu\text{g/dl}$
Gustavsson y Gerhardsson	2005	Mujer con bala de plomo en colon	Suecia	550 $\mu\text{g/l}$
Laborde et al.	2006	47 trabajadores de fabrica de baterías	Uruguay	48,9 (31,7-76,9) $\mu\text{g/dl}$
Molina et al.	2007	65 trabajadores de estaciones de servicio	Mérida, Venezuela	83,74 +/- 28,95 $\mu\text{g/l}$
Rodríguez y Espinal	2008	63 niños en sus viviendas (87% cercanas a talleres mecánicos y pintura)	Santo Domingo, Rep. Dominicana	16,7 (1,4-61,9) $\mu\text{g/dl}$
Tian et al.	2010	Trabajadores de fabrica de baterías	China	654,03 $\mu\text{g/l}$

El efecto del gradiente de contaminación fue considerado por Ordóñez et al. (2003), quien reportó que los valores de plomo en sangre de niños entre 1 y 9 años de edad que habitaban a una cierta distancia de una fundición de la Ciudad Juárez, Méjico; los niños que vivían a menos de 1,6 km presentaron un valor promedio de 38,66 $\mu\text{g dl}^{-1}$, de los cuales el 19,5% de presentaron concentraciones de 60 $\mu\text{g dl}^{-1}$ ó superiores; entre 1,6 y 4 km tuvieron valores promedio de 31,59 $\mu\text{g dl}^{-1}$; entre 4,1 y 6,4 km el promedio fue 28,70 $\mu\text{g dl}^{-1}$; entre 6,5 y 9,6 km el promedio fue 28,49 $\mu\text{g dl}^{-1}$ y entre 9,7 y 12,8 km el promedio fue 27,71 $\mu\text{g dl}^{-1}$.

Bernasconi et al. (2012) Encontraron una concentración máxima de 37 mg Pb kg⁻¹ en materiales lixiviados acuosos encontrados en árboles de la localidad de Florencio Varela, próximos a una fábrica recuperadora del metal. Este valor, disminuyó a 4,2 mg Pb kg⁻¹, a 300 metros de distancia de la industria. También pudieron verificar en aire que las altas cantidades de plomo (valor medio= 1,85 µg Pb cm⁻²) en material sedimentable obtenido en colectores colocados en casas de vecinos a la fábrica, disminuyó a la distancia de 400 m de la fábrica llegando a valores similares a los obtenidos en zonas residenciales tomadas como referencia (0,6 µg Pb cm⁻²). Las mayores concentraciones fueron comparables con las obtenidas en zonas fabriles de la ciudad de La Plata.

Hay que considerar también, no solamente el efecto de la exposición laboral, sino que son los propios trabajadores quienes transportan el metal hacia el hogar y constituyen la fuente de contaminación domiciliar. Se ha comprobado que los hijos de trabajadores de la industria tienen niveles de plomo en sangre significativamente mayores (Ordóñez et al., 2003).

En la Tabla 28, se muestra como se fueron reduciendo en EEUU, los valores de plomo en sangre utilizados como criterio de diagnóstico para la intoxicación en niños. Estos cambios se basaron en el conocimiento de los daños biológicos generados por los efectos tóxicos del metal (Piomelli, 2003).

Tabla 28. Cambios de criterios en la definición de la intoxicación por plomo en niños de EEUU a través del tiempo (Piomelli, 2003)

Fecha	Valor de plomo (µg dl ⁻¹)
1960's	80
1970's	60
1980's	30
1991	10

Actualmente se sabe que una exposición prolongada a bajas concentraciones de plomo (plombemias inferiores a los 10 µg dl⁻¹) provoca alteraciones (Tabla 29) neuromotoras, pérdida irreversible de la inteligencia, problemas de conducta y bajo rendimiento escolar (PRECOTOX, 2013).

Tabla 29. Trabajos que reportaron daños tóxicos del plomo, con concentraciones de plumbemia menores de 10 µg dl-1 (PRECOTOX, 2013).

Efecto	Plumbemia (µg/dL)	Referencia
Riesgo aumentado para TDAH en niños de 4-15 años de edad	>1.3	Braun et al. 2006
Asociación significativa con las puntuaciones para el TDAH en niños 8-11 años de edad	1.9	Cho et al. 2010
Disminución del rendimiento en las pruebas estandarizadas de lectura y matemáticas en el 4to grado.	2	Miranda et al. 2007b
Riesgo aumentado para el TDAH en niños de 8 a 15 años.	>2	Froelich et al. 2009
Disminución del CI	2.1	Jusko et al. 2008
Asociación con TDAH	<2.2	Nigg et al. 2010
Aumento de falta de atención e hiperactividad en niños de 8-10 años de edad	≥2.2	Kim et al. 2010
Descenso del CI en niños de 10 años.	2.5	Schnaas et al. 2006
Depresión mayor, ataques de pánico y trastorno de ansiedad generalizado en adultos jóvenes de 20–39 años.	3	Bouchard et al. 2009
Asociación con TDAH	3.47	Nigg et al. 2008
Descenso del CI e hiperactividad en niños de 8 a 11 años.	3.74	Kim et al. 2010
Sin descensos del CI en niños de 6 a 10 años	3–4	Surkan et al. 2007
Sin efecto sobre los tests estandarizados de resultados escolares en niños de 7 y 8 años.	2–5	Chandramouli et al. 2009
Score descendido en el test de Fagan para inteligencia infantil en niños de 7 meses de edad.	<5 (cordón umbilical)	Emory et al. 2003
Asociación leve con déficit de las funciones cognitivas en niños de 12 a 36 meses de edad.	<5 (cordón umbilical)	Jedrychowski et al. 2009
Descenso del CI y bajo rendimiento académico en niños de 4 a 11 años de edad (verbal y no verbal)	5	Min et al. 2009
Descenso del CI y otras alteraciones neurológicas en niños de 7 a 9 años.	5.4	Chiodo et al. 2004
Disminución del Índice de Desarrollo Mental de Bayley (MDI) en niños de 2 años.	5–10	Tellez-Rojo et al. 2006

5.2.1-Parámetros hemáticos de trabajadores expuestos al plomo

Al comparar los resultados obtenidos para el grupo de trabajadores con datos de bibliografía de la OMS (Dacie y Lewis, 1995), los parámetros hematológicos estudiados (RGR, Hb, Hto, RGB, VCM, HCM, CHCM, PLQ) no han mostrado ser índices sensibles de la exposición crónica al plomo en la población estudiada, dado que las diferencias halladas no fueron clínicamente significativas (Ventimiglia et al., 2003), es decir que no representaron un cambio en el Estado de Salud del individuo. Por otra parte, tampoco se pudo corroborar la presencia de una anemia normocítica e hipocrómica, es decir con disminución en los valores de Hb y HCM como se esperaría en el saturnismo (Vives Corrons, 2001). Respecto de la bibliografía consultada, el único parámetro hematológico que, mostró una diferencia significativa fue el RGR, siendo menor en el grupo de trabajadores expuestos al plomo.

Existe otra manifestación importante de la intoxicación por plomo: la inhibición de la enzima 5' nucleotidasa, que si es suficientemente severa induce la aparición un hallazgo morfológico en los hematíes, conocido como de punteado basófilo (Paglia et al., 1975), y la prematura hemólisis de los glóbulos rojos (Vives Corrons, 2001). En el examen microscópico de los frotis sanguíneos de los trabajadores, no se observó punteado basófilo que podría indicar la existencia de una compensación de la intoxicación crónica. El hecho de haber obtenido estos resultados aparentemente negativos en relación a lo esperado, no quiere decir que no exista intoxicación, sino que es necesario evaluar otros parámetros que permitan evaluar esta exposición, discriminando los individuos expuestos de los no expuestos, y con suficiente sensibilidad para su utilización en el diagnóstico precoz de la intoxicación plúmbica (Ventimiglia et al., 2003)

Para tal fin, se estudiaron otros biosensores bioquímicos y hematológicos de exposición y efecto en trabajadores expuestos al plomo, δ -ALAD y PEL.

Schumacher et al. (1997), encontraron diferencias significativas entre niveles de plomo en sangre de trabajadores y el grupo de control, así como para Protoporfirinas (ZPP) y ALAD y ALAD-U, observando que este hallazgo tenía relación con el tiempo de exposición al tóxico. Así, grupos de trabajadores que estuvieron expuestos al metal durante jornadas de 8 hs día⁻¹ presentaron estas alteraciones, mientras que no fue posible obtener diferencias significativas en estos parámetros, para los trabajadores expuestos 2hs día⁻¹ y del mismo modo para el grupo control. Las concentraciones medias de plomo en sangre para los trabajadores fue 21.0

(7,9- 47,0) $\mu\text{g dl}^{-1}$ y para los controles 11.3 (5,2- 22,5) $\mu\text{g dl}^{-1}$. Sin embargo, al medir metalotioneínas y creatinina en sangre de los mismos individuos, no se encontraron diferencias significantes entre grupos (Schumacher et al., 1997). Los trabajadores que tuvieron niveles superiores a 40 $\mu\text{g dl}^{-1}$ presentaron un valor medio de ALAD de 19,9 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ l}^{-1}$ GR, siendo el biomonitor más sensible.

En el grupo de trabajadores estudiado por nosotros, la actividad de la ALAD resultó inhibida en el 73% de las muestras analizadas con respecto al valor ($> 20 \text{ U l}^{-1}$) tomado de referencia (Ventimiglia et al., 2004). Sin embargo, al comparar el valor medio de los resultados con un grupo de pobladores vecinos a la fábrica, se encontró una disminución del 57% en ALAD de los trabajadores respecto a este grupo control, indicando la afectación de este último grupo por la contaminación ambiental. Este grado de inhibición, fue similar al encontrado en otros trabajos. Hernberg y Nikkanen (1970), a concentraciones de plomo en sangre de 16 $\mu\text{g dl}^{-1}$, informaron un 50 % de actividad enzimática, mientras que a concentraciones de 55 $\mu\text{g dl}^{-1}$, la inactivación fue del 90%, demostrando una correlación negativa entre los niveles de plomo en sangre y la actividad de la ALAD.

Se demostró una correlación positiva entre la plumbemia y el nivel de protoporfirina eritrocitaria, encontrándose un nivel anormal de protoporfirinas en el 50% de los casos con concentraciones de plomo en sangre de 32 $\mu\text{g dl}^{-1}$ (Piomelli et al., 1982). El nivel de protoporfirinas eritrocitarias es un indicador de daño metabólico y es un test efectivo en la intoxicación severa por plomo, pero no debería utilizarse con niveles de plomo en sangre por debajo 40-50 $\mu\text{g dl}^{-1}$ (Piomelli, 2002). Al analizar los datos obtenidos para los trabajadores, con respecto a valores de referencia, se encontró que la concentración de PEL estuvo elevada en el 62% de las muestras, pero al comparar el grupo de individuos expuestos laboralmente con el grupo control se registró un aumento de 435% en la concentración.

De la comparación de estos resultados obtenidos en la población estudiada, puede interpretarse que la actividad de la ALAD sanguínea, sería un biomarcador de efecto de elección debido a su mayor sensibilidad (Ventimiglia et al., 2004).

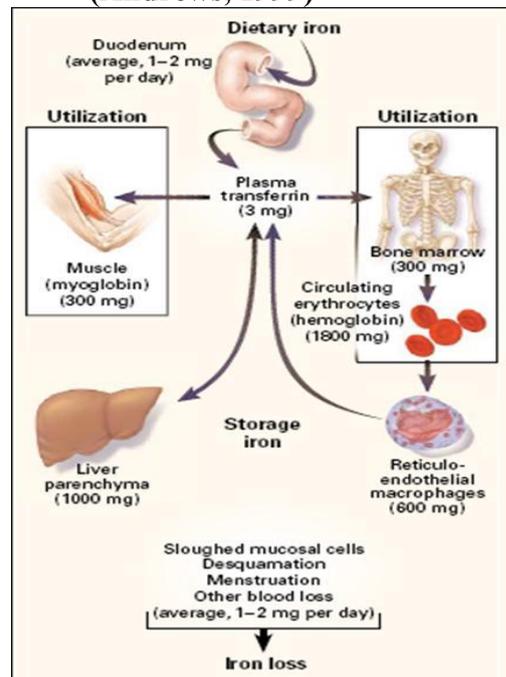
Takebayashi et al. (1993), sugieren que la medida de Pb-S y ALAD es la combinación más adecuada para el screening de trabajadores laboralmente expuestos al plomo. Nuestros resultados coinciden con dicha sugerencia.

5.2.2-Estado del hierro

El hierro es un metal esencial para la gran mayoría de las formas de vida, desde los organismos unicelulares hasta las más complejas y organizadas, que lo han seleccionado por dos motivos principales: debido a su abundancia en la corteza terrestre y por poseer la propiedad de oxidarse y reducirse. Es por este último que forma parte del grupo prostético de numerosas enzimas, teniendo un papel fundamental en el transporte de oxígeno en la mioglobina y hemoglobina (Pintado Cros et al, 2001).

El hierro en el organismo de un hombre adulto normal, varía entre 35-45 mg.kg⁻¹ de peso y se encuentra distribuido en diferentes compartimientos o *pooles*: de utilización o hierro funcional, que constituye dos tercios del total; de transporte, que representa el 5% del total y el de reserva (Andrews N, 1999). Se absorbe aproximadamente 1-2 mg día⁻¹ de hierro, para reponer las pérdidas del metal (Figura 29).

Figura 29. Pooles de hierro en el organismo.
(Andrews, 1999)

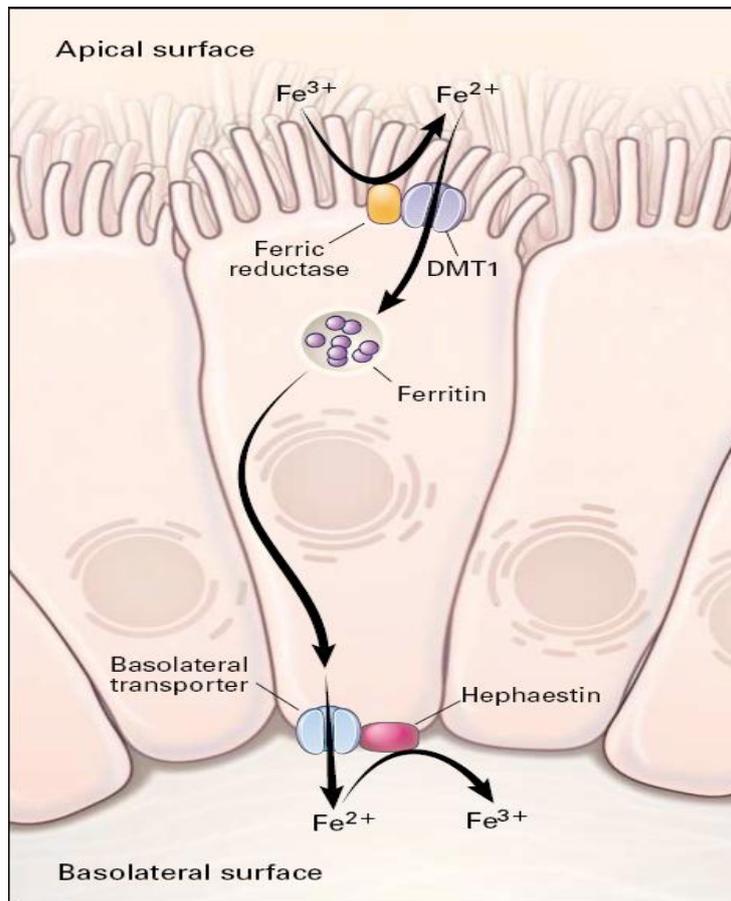


Este balance del metabolismo del hierro, está regulado a nivel de la absorción intestinal (Pintado Cros, 2001). Hacia fines del siglo pasado, se realizaron grandes avances en el conocimiento del mecanismo de absorción de este metal. Gunshin et al (1997), caracterizaron la proteína de transporte que facilita el ingreso del hierro al enterocito. Este transportador de metales divalentes (DMT1, también llamado Nramp2 o DCT1) es una proteína

transmembrana de 12 segmentos que transfiere hierro no hemínico a través de la membrana apical hacia el citoplasma del enterocito, en un proceso dependiente de una bomba de protones (Andrews, 1999). El transportador DMT1, no es específico para el hierro y puede transportar una gran variedad de metales iónicos divalentes incluyendo manganeso, cobalto, cobre, zinc, cadmio y plomo (Osatinsky, 2004).

Para su absorción, el hierro, debe atravesar dos membranas, cada transportador transmembrana está asociado a una enzima que cambia el estado de oxidación (Figura 30). El transportador apical, se identificó como DMT1, y actúa coordinadamente con una enzima que posee acción ferrireductasa. El transportador basolateral ferroportina, actúa junto a una enzima similar a la ceruloplasmina, la hefeestina (Cailliat, 2011).

Figura 30. El transporte de hierro no hemínico a través del epitelio intestinal (Andrews, 1999).

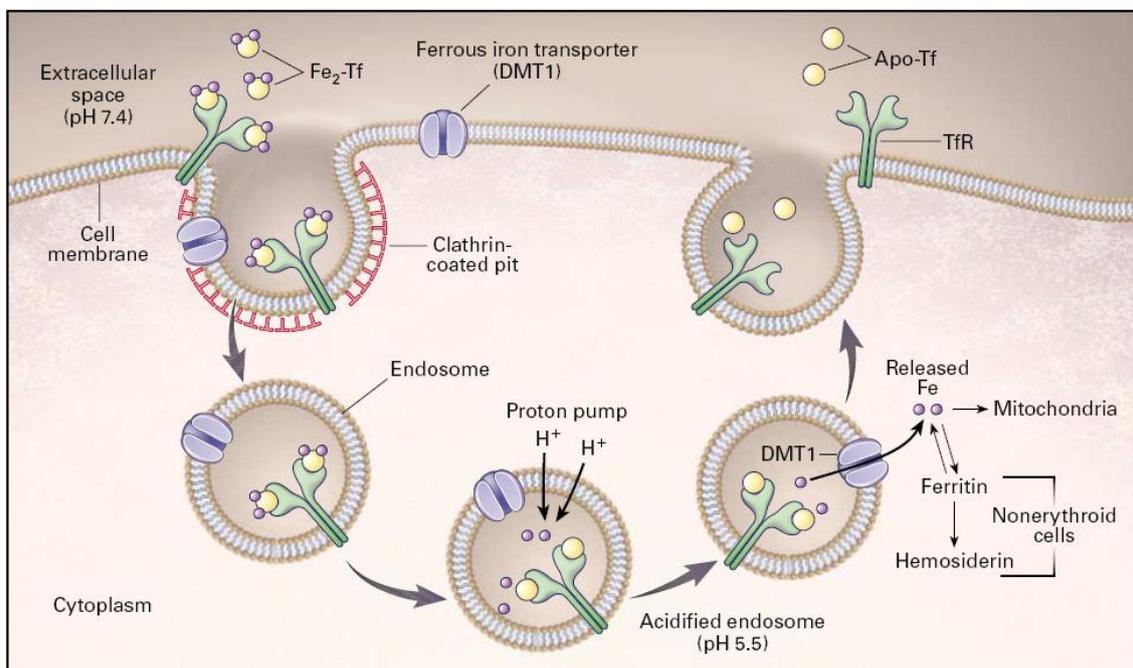


De este modo, existe una regulación negativa entre los requerimientos de hierro del organismo y la absorción intestinal. La absorción aumenta cuando los depósitos corporales disminuyen, o cuando aumenta la actividad de la eritropoyesis, o bien cuando existe anemia o hipoxemia. La anemia por deficiencia de hierro, es la condición mejor estudiada, donde se

encontró que existe un estímulo en la síntesis de DMT1 del epitelio intestinal, medido por el aumento de su ARN mensajero (Fleming R y Bacon B, 2005).

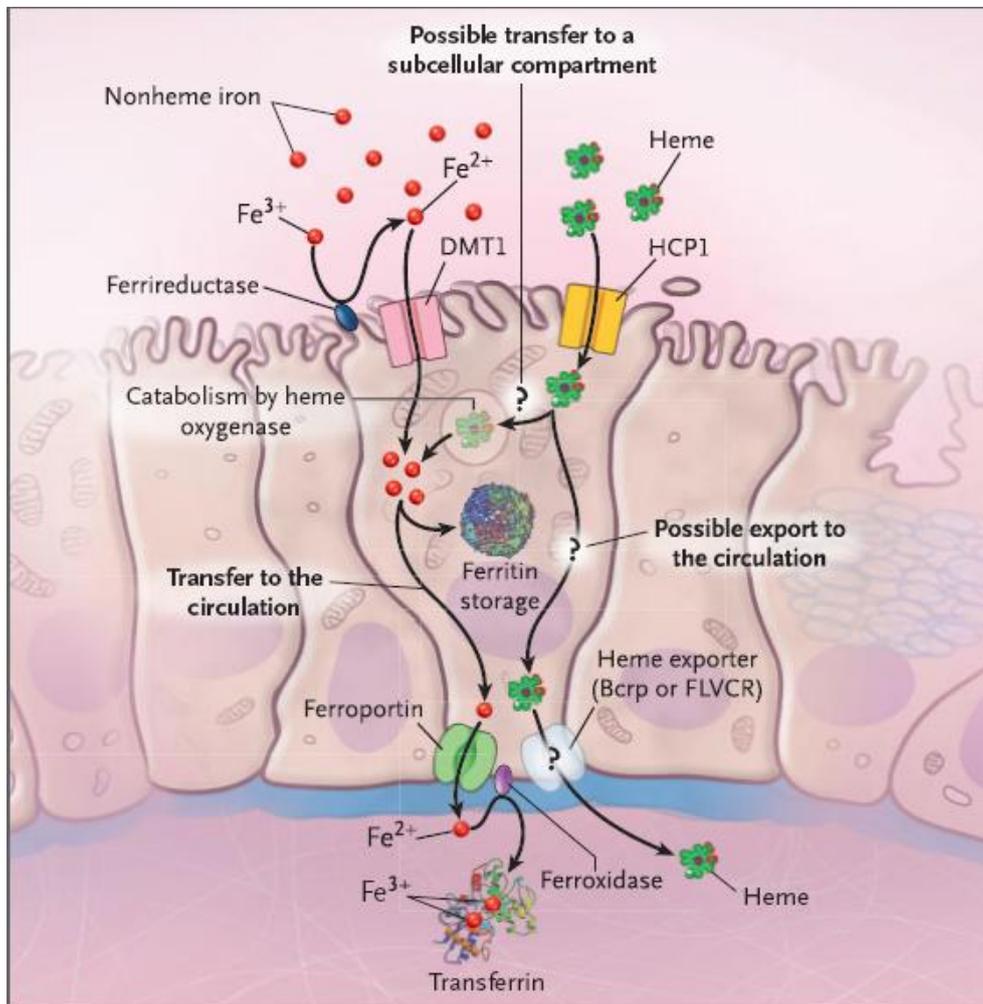
Una vez que el Fe fue absorbido y pasa a la sangre para ser transportado por la transferrina ($\text{Fe}_2\text{-Tr}$), siendo direccionado hacia los hoyos de clatrina, para ser endocitado (Figura 31). Una bomba de protones disminuye el pH dentro del endosoma, conduciendo a un cambio conformacional en la transferrina que permite la liberación del hierro. El transportador DMT1 libera el hierro desde el endosoma hacia el citoplasma celular donde se utilizará en la síntesis del grupo hemo o se acumulará en la ferritina.

Figura 31. Absorción de hierro en el precursor eritroide (Andrews, 1999).



Shayanghi et al (2005) reportaron la existencia de una proteína transmembrana en el epitelio del intestino proximal, HCP1, donde la absorción del grupo hemo es mayor. Es el primer transportador descrito para la absorción del grupo hemo en mamíferos (Figura 32). Luego de su ingreso al enterocito, el grupo hemo puede ser catabolizado por la enzima hemo oxigenasa con el consiguiente liberación de hierro o seguir hacia la membrana basal, donde existen dos proteínas (Bcrp y FLVCR) que podrían llegar a exportarlo hacia la sangre donde puede circular en forma libre o unido a la hemopexina (Andrews, 2005).

Figura 32. Mecanismo de absorción del hierro hemínico, mediado por la proteína HCP1, expresada en la membrana apical del enterocito (también se la encontró en hígado y riñón). No se conoce el mecanismo exacto del tránsito del grupo hemo por el enterocito. Existen dos proteínas que intervienen en la liberación del hemo hacia la sangre, Bcrp y FLVCR, que sugieren que el grupo prostético transita el enterocito en forma intacta (Andrews, 2005).



La transferrina es la molécula de transporte de hierro en el plasma sanguíneo. Es una betaglobina de PM 79 kDa y es capaz de unir dos átomos de hierro por molécula, pero sólo en su forma oxidada (Fe^{+3}), por lo que antes de unirse a su transportador, el metal debe ser oxidado por una ferroxidasa plasmática, la ceruloplasmina. La vida media de la transferrina en la circulación, es de 8 días y es sintetizada por el hígado principalmente. Esta síntesis hepática de transferrina, está regulada por el nivel de hierro dentro del mismo hepatocito, de manera tal que cuando esta concentración disminuye, aumenta la síntesis de transferrina. Por tal motivo, en la anemia ferropénica, el descenso de hierro plasmático se acompaña siempre de un aumento de la transferrina y de su capacidad de saturación. La transferrina en circulación no está completamente saturada con hierro, existe una

proporción libre del metal (apotransferrina), con una molécula de hierro (monosaturada), y/o con dos moléculas de hierro (disaturada). La prevalencia de estas formas, dependerá del estado de hierro en el organismo, así en la anemia ferropénica, predomina la forma apotransferrina y en estados de sobrecarga de hierro férrica, las formas disaturadas. La cantidad de hierro que es capaz de fijar el plasma es lo que se denomina Capacidad total de fijación de hierro (CTFH) y constituye una medida indirecta de la concentración de transferrina. El índice de saturación de la transferrina (IST), es un índice que se calcula entre la ferremia y la CTFH, disminuye en la ferropenia y está aumentado en estados de sobrecarga. En un individuo sano, sólo un 30 a 35 % de la transferrina circulante esta saturada con hierro (Vives Corrons, 2001).

La deficiencia en la utilización de hierro, provoca un aumento en los *pooles* de transporte y reserva del metal, constituyendo estados de sobrecarga de hierro, pudiendo detectarse en sangre a través del estudio de la ferremia, CTFH, transferrina sérica y de la ferritina sérica. En estos estados, se observa un incremento de los valores de hierro sérico, que puede deberse, en el caso de la intoxicación plúmbica, principalmente por inhibición de las enzimas que intervienen en la síntesis del grupo hemo. Esto está descrito en la bibliografía especializada para el caso de las porfirias, pero no ocurre así en el caso de la intoxicación plúmbica (Vives-Corrons, 2001).

Este efecto sobre el metabolismo de Fe, está agravado en individuos con escasa ingesta de este metal y así también en individuos expuestos al plomo, como por ejemplo en la exposición laboral, dado que este último compite por el transportador que interviene en el mecanismo de absorción (DMT1) del primero.

En este trabajo, se tomó una muestra en 26 trabajadores laboralmente expuestos al plomo y 10 individuos control, en los cuales se realizó una evaluación del estado del hierro en el organismo, mediante la medida de la ferremia, es decir el hierro en el compartimiento de transporte. Dicho parámetro expresado como promedio \pm DE, fue $150.5 \pm 42.7 \mu\text{g dl}^{-1}$ en los operarios y $86,1 \pm 20,3 \mu\text{g dl}^{-1}$ en los controles (Ventimiglia et al., 2007). Como valores de referencia hemos considerado los de Artaza et al. (1999): $87.0 \pm 5.1 \mu\text{g dl}^{-1}$, por haber sido obtenidos en una población de nuestro país. Además, los resultados hallados en el grupo control están en concordancia con la bibliografía según Artaza et al. (sesgo = -1,03%).

Estos resultados sugieren un importante aumento (aproximadamente 75 %) de la ferremia en los individuos expuestos respecto al grupo control. Existen datos en la bibliografía acerca de la elevación de la concentración

sérica de hierro por una exposición leve o moderada al plomo (Zielhuis et al., 1978). Por un lado, la ferremia aumenta como consecuencia de la deficiente utilización biológica de este metal, secundaria a la inhibición enzimática de la biosíntesis del grupo prostético Hemo. En segundo lugar, la falta del grupo prostético, provoca un déficit en la síntesis de la hemoglobina, una eritropoyesis ineficaz que conduce a la anemia (Piomelli, 2003).

En adultos, un moderado descenso de la concentración de hemoglobina comienza cuando la concentración de plomo en sangre es de $50 \mu\text{g dl}^{-1}$. En trabajadores de la industria del plomo recientemente incorporados, se observa un descenso (de 14 a $13,4 \text{ g dl}^{-1}$) en el nivel de hemoglobina a los tres meses de exposición (U.S.EPA, 1977). La consecuencia de la deficiencia en la síntesis de hemoglobina es una pérdida en la capacidad de transporte de oxígeno hacia los tejidos. De este modo, se estimula la eritropoyesis, por un lado, que será ineficiente para la síntesis del grupo hemo (por la inhibición enzimática), y con la necesaria e inevitable movilización de hierro desde los lugares de reserva, y con el aumento de la absorción intestinal de hierro y plomo. Se ha observado una correlación negativa entre el nivel de hemoglobina y la concentración sérica de plomo en 40 niños que presentaban plumbemias entre 30 a $120 \mu\text{g dl}^{-1}$ (Piomelli, 2003).

Por lo dicho anteriormente, se concluye que este parámetro podría ser adoptado como biomarcador de exposición crónica al Pb (Ventimiglia et al., 2007).

Un aspecto controversial para considerar a la ferremia como biomarcador, puede surgir al considerar la marcada y conocida variabilidad biológica del hierro sérico, que es del orden de 26,5% intraindividuo (Ricos, 2010), ya que se trata de una variabilidad comparativamente alta en relación con otros analitos séricos. Para evitar esta fuente de error, es muy importante el control de todos los factores pre-analíticos (hora de la toma de muestra, ayuno, dieta, etc.) mediante la estandarización del procedimiento de la toma de muestras (Fernandez Espina y Mazziotta, 2005). Los CV entre individuos obtenidos, se compararon con los datos de bibliografía; en nuestro caso, el CV fue menor en los controles (23,5%) respecto de los trabajadores (28,3%).

5.3 *Rhinella arenarum* como modelo de distribución de plomo en el organismo

El sapo *Rhinella arenarum*, es parte de la fauna autóctona argentina, al ser un anfibio, pasa parte de su ciclo vital en el agua y en tierra, característica que, junto con su relativa tolerancia a la presencia del plomo en el ambiente, lo hacen es una especie ideal para su uso en aplicaciones en el monitoreo ambiental (Ventimiglia et al., 2009). Puede encontrárselo en los terrenos periféricos de las grandes urbes de nuestro país, donde la actividad antrópica genera grandes problemas de contaminación. Por otra parte, su pequeño tamaño y su buena adaptación a condiciones de cautiverio, lo hacen particularmente apto para los trabajos de laboratorio (Fink y Salibián, 2005).

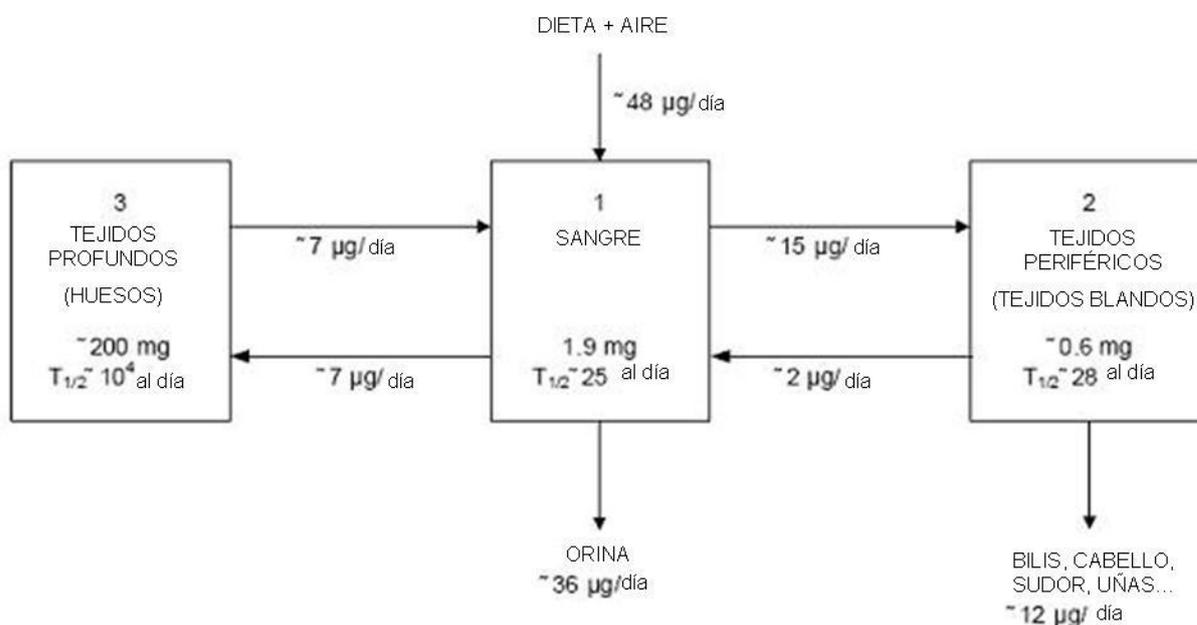
La resistencia al plomo fue demostrado por la mortalidad nula en las experiencias con dosis subletales. Por otro lado, en estos animales al momento de su captura, se encontraron niveles de plomo prácticamente constantes en un estudio en el cual realizaron muestreos durante aproximadamente 3 años (Arrieta et al., 2001).

La DL 50 fue inicialmente estudiada para *Rhinella arenarum* por Arrieta et al. (1999) para las temperaturas 20 y 28, 5°C. Se adaptó una técnica para ALAD en nuestro laboratorio, basada en el método europeo de Berlin y Schaller (Perí et al., 1998). Al igual que en humanos, en *Rhinella arenarum* se han encontrado correlaciones entre la plumbemia y la disminución de la ALAD (Perí et al., 1998) y el aumento de la Protoporfirina (Arrieta et al., 2003) así como también la alteración de parámetros hematológicos (Perí et al., 1998).

Como se mencionó anteriormente, la elección del modelo de Rabinowitz et al. (1976) se realizó por ser un modo simplificado (Figura 33) de representación de la ruta de un tóxico en el organismo. En este sentido, el cuerpo está representado por un *pool* central, la sangre, que está en relación a tejidos blandos (poco profundos, de alta velocidad de recambio) y el hueso (con baja velocidad de intercambio) (O'Flaherty, 1987).

De las vías de excreción estudiadas en humanos por Rabinowitz et al., la intestinal resultó ser la de mayor importancia para el plomo metálico. En nuestro caso, fue la vía urinaria debido a la forma de administración del tóxico, por lo que las demás vías resultaron despreciables para *Rhinella arenarum*.

Figura 33. Modelo de Rabinowitz et al. (1976), representa la ruta de un tóxico en el organismo humano. Luego de su absorción, el plomo pasa al compartimiento central donde se pone en “contacto” con un compartimiento de tejidos blandos (rápido) y uno de tejidos profundos (lento).

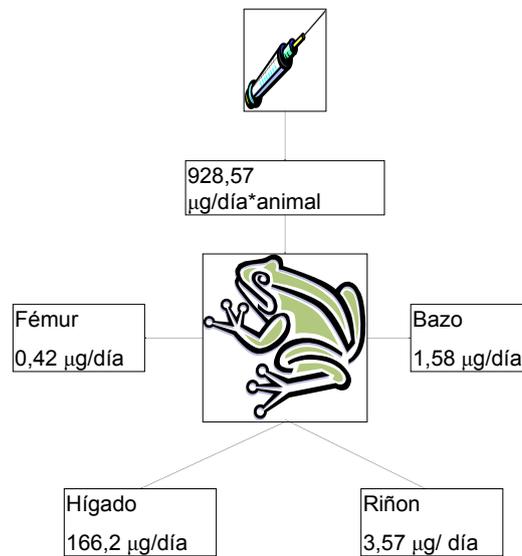


El modelo de Rabinowitz predice tiempos de vida media para el plomo de aproximadamente 25, 28 y 10^4 días en el compartimiento central, superficiales y profundos, respectivamente (Rabinowitz et al., 1976). La lenta cinética de los tejidos profundos, conduce a la predicción que contienen la mayoría de la carga de plomo después de exposiciones prolongadas (por ejemplo, años), siendo coherente con las mediciones de plomo en muestras de autopsias humanos. De acuerdo con estas observaciones, en las experiencias realizadas por nosotros de unos 42 días, y en base a los resultados obtenidos, resultó despreciable la acumulación en hueso respecto a la de los compartimientos superficiales (tejidos blandos).

Para riñón y bazo, los valores obtenidos son comparables al modelo de Rabinowitz et al., sin embargo no es así para el hígado, donde se encontró un valor superior. Del mismo modo, en el caso del compartimiento óseo, el valor hallado fue inferior al reportado por este autor. Esto puede interpretarse por la metodología utilizada en las experiencias, ya que la inyección fue semanal y en el tiempo que duraron las experiencias, no se observó una ganancia significativa del tejido óseo (Figura 34). Se concluye que en el modelo experimental empleado, a corto plazo, es decir, en el tiempo que transcurrieron los experimentos, la mayor ganancia del metal, y por lo tanto, las mayores velocidades de acumulación del plomo, estuvieron

dadas por los tejidos blandos respecto al tejido óseo. El compartimiento de mayor acumulación de plomo fue el hepático (Ventimiglia et al 2009).

Figura 34. Tasas de ganancia diaria de plomo en órganos.
(Ventimiglia et al., 2009)



Bibliografía

Abdulla M, Haeger-Aronsen B. ALA-dehydratase activation by zinc. *Enzyme*. 1971; 12(6): 708-10.

ACGIH. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati, Ohio: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 2004.

ACUMAR. 2013 a. Medición del estado del agua superficial y subterránea. Análisis e interpretación de los resultados. Informe trimestral enero-marzo 2013. Autoridad de cuenca Matanza-Riachuelo (ACUMAR). Dirección general técnica. Coordinación de Calidad Ambiental, abril 2013, [acceso noviembre de 2013]. Disponible en www.acumar.gov.ar

ACUMAR. 2013 b. Estado del agua superficial y subterránea. Análisis e interpretación de los resultados. Informe trimestral julio-septiembre 2013. Autoridad de cuenca Matanza-Riachuelo (ACUMAR). Dirección general técnica. Coordinación de Calidad Ambiental, octubre 2013, [acceso noviembre de 2013]. Disponible en www.acumar.gov.ar

Albert LA, Badillo F. Environmental lead in Mexico. *Rev Environ Contam Toxicol*. 1991; 117:1-49.

Albiano NF. Toxicología Laboral - Criterios para el monitoreo de la salud de los trabajadores expuestos a sustancias químicas peligrosas. [Libro en Internet]. Argentina: Superintendencia de Riesgos del Trabajo; 2011 [acceso noviembre de 2013]. Disponible en: <http://www.srt.gov.ar/adjuntos/toxicologia/libroalbiano.pdf>

Alessio L. Relationship between "chelatable lead" and the indicator of exposure and effect in current and past occupational exposure. *Sci Total Environ*. 1988; 71(3):293-9.

Al-Hakkak ZS, Hamamy HA, Murad AM, Hussain AF. Chromosome aberrations in workers at a storage battery plant in Iraq. *Mutat Res*. 1986; 171(1):53-60.

Al-Modhefer AJ, Bradbury MW, Simons TJ. Observations on the chemical nature of lead in human blood serum. *Clin Sci (Lond)*. 1991; 81(6):823-9.

Andersen ME, Krishnan K. Relating *in vitro* to *in vivo* exposures with physiologically based tissue dosimetry and tissue response models. En: Salem H, ed. *Animal test alternatives: Refinement, reduction, replacement*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995. p. 9-25.

Anderson WL. Legislation and lawsuits in the United States and their effects in nontoxic shot regulations. En: Pain DJ (ed) *Lead poisoning in waterfowl*. Slimbridge, UK: International Waterfowl and Wetlands Research Bureau, 1992. IWRB Spec publ 16. p 56-60.

Andrews N. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*, 1999; 341 (26):1986-1996.

Andrews N. Understanding Heme Transport. *N Engl J Med*, 2005; 353 (23): 2508-2509.

A.N.M.A.T. Bebidas Hidricas, Agua y Agua Gasificada. En: A.N.M.A.T. Código Alimentario Argentino. Argentina: [s.e.], 2010. Cap. XII. [Acceso abril de 2011]. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XII.pdf

Antoniuzzi CE, López JA, Duré M, Falico DA. Alimentación de dos especies de anfibios (Anura: Hylidae) en la estación de bajas temperaturas y su relación con la acumulación de energía en Santa Fe, Argentina. Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744), 2013; 61 (2): 875-886.

Araki S, Aono H, Yokoyama K, Murata K. Filterable plasma concentration, glomerular filtration, tubular balance, and renal clearance of heavy metals and organic substances in metal workers. Arch Environ Health. 1986; 41(4):216-21.

Aranguren Zuleta F, Burguera JL, Burguera M, Montilla J. Concentraciones de plomo en sangre y orina de trabajadores en expendios de gasolina, Trujillo- Venezuela. Geoenseñanza, 2003; 8 (2): 83-93

Arrieta MA, Rosenberg CE, Fink NE, Salibián A. Toxicidad aguda del plomo para *Bufo arenarum* a dos temperaturas. Acta Toxicol. Argent. 2000; 8:35

Arrieta et al. 2000b. Arrieta MA, Perí SI, Apartin C; Rosemberg CE, Fink NE, Salibián A. Blood lead concentration and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in adult *Bufo arenarum*. Arch Physiol Biochem. 2000; 108(3):275-280

Arrieta MA, Apartin C, Rosenberg CE, Fink NE, Salibián A. Blood lead content in a peri-urban population of the South American toad *Bufo arenarum*. Sci Total Environ. 2001; 271(1-3):99-105.

Arrieta MA Rosenberg CE, Ventimiglia F, Fink NE Salibián A. Actividad de la δ -ALAD sanguínea como biomarcadora del plomo en *Bufo arenarum*. Acta Toxicol Argent. 2003; 11(1):24

Arrieta MA, Bruzzone L, Apartin C, Rosenberg CE, Fink NE, Salibián A. Biosensors of inorganic lead exposure and effect in an adult amphibian. Arch Environ Contam Toxicol. 2004; 46(2):224-30.

Astrin KH, Bishop DF, Wetmur JG, Kaul B, Davidow B, Desnick RJ. Delta-Aminolevulinic acid dehydratase isozymes and lead toxicity. Ann N Y Acad Sci. 1987; 514: 23-9.

ATDSR. The nature and extent of lead poisoning in children in the United States: a report to Congress Atlanta, Ga.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1988. [Acceso Febrero de 2013]. Disponible en: <http://www.eric.ed.gov/PDFS/ED324135.pdf>.

ATSDR. Resumen de Salud Pública: Plomo. Atlanta, Ga.: Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, División de Toxicología y Medicina Ambiental, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU, 2005.

ATSDR. Toxicological profile for lead. Atlanta, Ga.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007. [Acceso Febrero de 2009]. Disponible en:
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>

Barltrop D, Barrett AJ, Dingle JT. Subcellular distribution of lead in the rat. *J Lab Clin Med.* 1971; 77(5):705-12.

Barton JC, Conrad ME, Nuby S, Harrison L. Effects of iron on the absorption and retention of lead. *J Lab Clin Med.* 1978; 92(4):536-47.

Bazar MA, Quinn MJ Jr, Mozzachio K, Bleiler JA, Archer CR, Phillips CT, Johnson MS. Toxicological responses of red-backed salamander (*Plethodon cinereus*) exposed to aged and amended soils containing lead. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2010; 58(4):1040-7.

Beck BD, Mattuck RL, Bowers TS, Cohen JT, O'Flaherty E. The development of a stochastic physiologically-based pharmacokinetic model for lead. *Sci Total Environ.* 2001; 274(1-3):15-9.

Bergdahl IA, Grubb A, Schütz A, Desnick RJ, Wetmur JG, Sassa S, et al. Lead binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. *Pharmacol Toxicol.* 1997; 81(4):153-8.

Bergdahl IA, Vahter M, Counter SA, Schütz A, Buchanan LH, Ortega F, et al. Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children. *Environ Res.* 1999; 80(1):25-33.

Berlin A, Schaller KH. European standardized method for the determination of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 1974; 12(8):389-90.

Bernard S. Dosimetric data and metabolic model for lead. *Health Phys.* 1977; 32:44-46

Bernasconi C, Apartin CD, Ronco AE. Estudio de la contaminación por plomo en un barrio del Conurbano Bonaerense. En: *Actas 7^{mo} Congreso de Medio Ambiente AUGM.* Buenos Aires: UNLP, 2012.

Bert JL, van Dusen LJ, Grace JR. A generalized model for the prediction of lead body burdens. *Environ Res.* 1989; 48(1):117-27.

Berzins DW, Bundy KJ. Bioaccumulation of lead in *Xenopus laevis* tadpoles from water and sediment. *Environ Int.* 2002; 28(1-2):69-77.

Beyer WN, Conner EE, Gerould S. Estimates of soil ingestion by wildlife. *J Wildl Manage.* 1994; 58:375-382.

Braun JM, Kahn RS, Froehlich T, Auinger P, Lanphear BP. Exposures to environmental toxicants and attention deficit hyperactivity disorder in U.S. children. *Environ Health Perspect.* 2006; 114 (12):1904-9.

Bressler JP, Olivi L, Cheong JH, Kim Y, Bannona D. Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1012:142-52.

Brodeur J. La soja y sus agroquímicos: evaluando impactos en anfibios. En: Camino M, Aparicio V. Aspectos ambientales del uso del Glifosato. Balcarce: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), 2010. p. 69-75

Boyer R, Grue C. The Need for Water Quality Criteria for Frogs. *Environ Health Perspect.* 1995; 103:352-357.

Buekers J, Redeker ES, Smolders E. Lead toxicity to wildlife: derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Science of the Total Environment.* 2009; 407 (11):3431-8.

Cabagna Zenklusen MC, Lajmanovich RC, Attademo AM, Peltzer PM, Junges CM, Fiorenza Biancucci G, Bassó A. Hematología y citoquímica de las células sanguíneas de *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) en Espinal y Delta-Islands del río Paraná, Argentina. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744).* 2011; 59 (1): 17-28.

Cailliat MC. Estudio para el mejoramiento de la calidad analítica en la determinación de hierro sérico en laboratorios de Análisis Bioquímicos. Tesis de Maestría en Ciencias del Laboratorio Clínico. Cátedra de Hematología. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. 2011.

Camacho Sánchez MI, Gamboa Delgado J. Biodisponibilidad de metales en agua salobre (3UPS) y su efecto tóxico en el langostino *Macrobrachium rosenbergii*. *Revista de toxicología on line RETEL*, 2003. [Acceso noviembre 2013]. Disponible en www.sertox.com.ar/retel

Camilión M, Hurtado M, Roca A, da Silva M. Nivel de plomo en suelos platenses afectados por emisiones vehiculares. *Acta Toxicol Argent.* 1996; 4: 66-7

Caplun E, Petit D, Picciotto E. Lead in petrol. *Endeavour.* 1984; 8(3): 135-144

Carr JH, Rodak BF. *Clinical hematology atlas.* Philadelphia: Saunders, 1999.

Carmignani M, Boscolo P, Preziosi P. Cardiovascular actions of lead in rats as related to the level of chronic exposure. *Arch Toxicol.* 1988; 12: 326-9.

Castellino N, Aloj S. Intracellular distribution of lead in the liver and kidney of the rat *Br J Ind Med.* 1969; 26(2):139-43.

CDC. Interpreting and Managing Blood Lead Levels <10 µg/dL in Children and Reducing Childhood Exposures to Lead: Recommendations of CDC's Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR.* 2007; 56(8)

CDC. Lead in Drinking Water and Human Blood Lead Levels in the United States. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR.* 2012; 61

- Chamberlain A. Effect of airborne lead on blood lead. *Atmos Environ*. 1983; 17:677-92.
- Chaparro JC, Pramuk JB, Gluesenkamp AG. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from a cloud forest of southeastern Peru. *Herpetologica*. 2007; 63(2): 203-12.
- Chiesa ME, Rosenberg CE, Fink NE, Salibián A. Serum protein profile and blood cell counts in adult toads *Bufo arenarum*(Amphibia: Anura: Bufonidae): effects of sublethal lead acetate. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2006; 50(3):384-91.
- Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association-American Water Works Association- Water pollution Control Federation, APHA-AWWA-WPCF, Maryland, 1998.
- Clewell HJ 3rd, Andersen ME. Risk assessment extrapolations and physiological modeling. *Toxicol Ind Health*. 1985; 1(4):111-31.
- CNH. anemia ferropénica. Guía de diagnóstico y tratamiento. Comité Nacional de Hematología (CNH). *Arch Argent Pediatr* 2009; 107(4):353-361
- Coulter WH. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proc Natl Elect Conf*. 1956; 12:1034-1040.
- Cox WM, Pesola GR. Images in clinical medicine. Buckshot ingestion. *N Engl J Med*. 2005;353(26):e23. [Acceso Febrero de 2013]. Disponible en: <http://www.nejm.org/cgi/content/full/353/26/e23>
- Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology*. 8ª ed. London: Churchill Livingstone, 1995.
- Dacie JV, Lewis SM. *Hematología práctica*. 10^{ma} ed. Philadelphia: Elsevier, 2006.
- De Cristóforo M. A. y Giannuzzi L. Plombemia, valores de referencia para sujetos adultos en el área de La Plata y Berisso. Argentina.XII Congreso Argentino de Toxicología. XXI Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología, I Jornada Rioplatense de Toxicología. Rosario, Argentina, 25-27 de setiembre 2001.
- De Cristóforo MA, Giannuzzi L. Plombemia. Valores de referencia para sujetos adultos en el área de La Plata y Berisso, Argentina. *Acta Toxicol. Argent*. 2002; 10(1):50.
- Deocampo DM, Reed J, Kalenuik AP. Road dust lead (Pb) in two neighborhoods of urban Atlanta, (GA, USA). *Int J Environ Res Public Health*. 2012;9(6):2020-30.
- DHHS. U.S. Department of Health and Human Services. Healthy people 2020. Occupational Safety and Health Objective 7. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services. 2010. [Acceso diciembre 2013] Disponible en www.cdc.gov.

Di Salvo L, Aab C, Pereyras S, Pattín J, Apezteguía M, Iannicelli JC, Girardelli A, Varea A. Plumbemia en niños de la ciudad de La Plata, Argentina y su relación con la deficiencia de hierro y los factores de exposición al plomo. *Arch Argent Pediatr.* 2009; 107(4):300-306

Durlach V, Lisovoski F, Gross A, Ostermann G, Leutenegger M. Appendicectomy in an unusual case of lead poisoning. *Lancet.* 1986; 22:687-8.

Ellenhorn MJ. Metals and related compounds. En: *Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning.* 2^{da} Ed. Los Angeles: William & Wilkins, 1997.

Ettinger AS, Téllez-Rojo MM, Amarasiriwardena C, Bellinger D, Peterson K, Schwartz J, et al. Effect of breast milk lead on infant blood lead levels at 1 month of age. *Environ Health Perspect.* 2004; 112(14):1381-5.

Food and Drug Administration (FDA). Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed. Washington DC: Food and Drug Administration FDA, 2004.

Fernández Espina C, Mazziotta D. *Gestión de Calidad en el Laboratorio Clínico.* Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2005.

Fernández-Fernández FJ, González-González C, Ameneiros-Lago E, Martínez-Deben FS, Pía G, Sesma P. Intoxicación crónica por plomo. *An Med Interna.* 2002; 19(3):130-2.

Fernandez R, Brocca E, Turello R. Plombemias en exámenes periódicos de trabajadores. *Acta toxicol Argent.* 2003; 11(2):64-104

Fink NE, Salibián A. Toxicological studies in adult amphibians: effects of lead. *Applied Herpetology.* 2005; 2(3):311-33.

Flatmark T, Romslo I. Energy-dependent accumulation of iron by isolated rat liver mitochondria. Requirement of reducing equivalents and evidence for a unidirectional flux of Fe(II) across the inner membrane. *J Biol Chem.* 1975; 250(16):6433-8.

Flegal AR, Smith DR. Lead levels in preindustrial humans. *N Engl J Med.* 1992; 326(19):1293-4.

Fleming AJ. Industrial Hygiene and medical control procedures. *Arch. Environ. Health.* 1964; 8:266.

Fleming RE, Bacon BR. Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med.* 2005; 352(17):1741-4.

Forni A, Cambiaghi G, Secchi GC. Initial occupational exposure to lead: Chromosome and Biochemical findings. *Arch Environ Health.* 1976; 31(2): 73-8.

Fracasso ME, Perbellini L, Soldà S, Talamini G, Franceschetti P. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. *Mutat Res.* 2002; 515(1-2): 159-69.

Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain R, Haas A, Haddad C, et al. The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History.* 2006; 297:1-370.

García, SI. Hidroarcenismo Crónico Regional Endémico HACRE: Módulo de capacitación. Programa de Control de las intoxicaciones. Ministerio de Salud de la Nación, 1ª edición, 2011.

García Fernández JC, Malamud M, Zanardi J, Roses OE, Ravenna AN, Ridolfi AS. Plombemia. Estudio comparativo de dos métodos y determinación de valores actuales en nuestro medio para personas expuestas y no expuestas. *Bol Acad Nac Med Argent.* 1984; supl: 55-84.

García Fernández JC, Roses OE, Villaamil EC, López CM, Zanardi JC, Conti MI, et al. Valores de referencia de aminolevulínico dehidratasa y correlación con la plumbemia. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* 1989; 23(2):217-22.

Goldstein GW. Lead poisoning and brain cell function. *Environ Health Perspect.* 1990; 89:91-4.

González-Estecha M, Trasobares Iglesias E, Cano Escudero S, Oliván Osambela P, Fuentes Ferrer M, Fernández Pérez C, et al. Determinación de plomo y cadmio en sangre y su relación con Fuentes de exposición. Estudio PESA 2008. *Rev Lab Clin.* 2009;2(3):115-23

Gonzalez Rivas CJ, Castillo GN, Acosta JC, Venzal JM, Guglielmone AA. Primer reporte de parasitismo de una garrapata blanda del género *Ornithodoros* (Ixodida: Argasidae) sobre *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) en el departamento de Valle Fértil, San Juan, Argentina. *Cuad herpetol.* 2012; 26 (2):95-7

Goodrum PE, Diamond GL, Hassett JM, Johnson JDL. Monte Carlo modeling of childhood lead exposure: Development of a probabilistic methodology for use with the USEPA IEUBK model for lead in children. *Hum Ecol Risk Assess.* 1996; 2(4):681-708.

Grandjean P, Nielsen T. Organolead compounds: environmental health aspects. *Residue Rev.* 1979; 72, 97-148.

Griffin S, Goodrum PE, Diamond GL, Meylan W, Brattin WJ, Hassett JM. Application of a Probabilistic Risk Assessment Methodology to a Lead Smelter Site. *Hum Ecol Risk Assess.* 1996; 5(4):845-68.

Grue CE, Hoffman DJ, Beyer WN, Franson LP. Lead concentrations and reproductive success in European starlings *Sturnus vulgaris* nesting within highway roadside verges. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological.* 1986; 42(2): 157-182

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of mammalian proton-coupled metal ion transporter. *Nature.* 1997; 388: 482-8

Gustavsson P, Gerhardsson L. Intoxication from an Accidentally Ingested Lead Shot Retained in the Gastrointestinal Tract. *Environmental Health Perspectives*. 2005; 113 (4): 491-493.

Hansen C, Buteler R, Procopovich E, Pagan G, Díaz B, Gait N, Medicina M, Mezzano M, Britos S, Fulginiti S. Niveles De Plomo En Sangre En Niños De La Ciudad De Cordoba. *Medicina*. 1999; 59: 167-170

Hecker LH, Allen HE, Dinman BD. Heavy metal levels in acculturated and unacculturated populations. *Arch Environ Health*. 1974; 29(4):181-5.

Hernberg S, Nikkanen G. Enzyme inhibition by lead under normal urban conditions. *Lancet*. 1970; 1: 63.

Hernberg S. Lead poisoning in a historical perspective. *Am J Ind Med*. 2000; 38(3):244-54.

Hogan K, Marcus A, Smith R, White P. Integrated exposure uptake biokinetic model for lead in children: empirical comparisons with epidemiologic data. *Environ Health Perspect*. 1998; 106 Suppl 6:1557-67.

Horgan FG, Quiring DY, Lagnaoui A, Salas AR, Pelletier Y. Exposure to lead induces hypoxia-like responses in bullfrog larvae (*Rana cateseiana*). *Environ Toxicol Chem*. 1999; 18(10):2283-8.

Huang XP, Feng ZY, Zhai WL, Xu JH. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in workers exposed to lead. *Biomed Environ Sci*. 1988; 1(4):382-7.

Hwang KY, Schwartz BS, Lee BK, Strickland PT, Todd AC, Bressler JP. Associations of lead exposure and dose measures with erythrocyte protein kinase C activity in 212 current Korean lead workers. *Toxicol Sci*. 2001; 62(2):280-8.

Ilizaliturri-Hernandez CA, González-Mille DJ, Mejía-Saavedra J, Espinosa-Reyes G, Torres-Dosal A, Pérez-Maldonado I. Blood lead levels, δ -ALAD inhibition, and hemoglobin content in blood of giant toad (*Rhinella marina*) to assess lead exposure in three areas surrounding an industrial complex in Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2013; 185 (2): 1685-1698.

INDEC. Instituto Nacional de Estadísticas y censos de la República Argentina. Censo 2010. [Acceso agosto de 2013]. Disponible en www.indec.gov.ar.

International Committee for Standardization in Hematology (ICSH). Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1986) and specifications for international haemoglobinocyanide reference preparation (3rd edition). International Committee for Standardization in Haematology; Expert Panel on Haemoglobinometry. *Clin Lab Haematol*. 1987; 9(1):73-9.

International Committee for Standardization in Haematology Expert Panel on Cytometry. Recommended methods for the determination of packed cell volume by centrifugation / prepared on behalf of the World Health Organization by the Expert

Panel on Cytometry of the International Committee for Standardization in Haematology. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1989.

Iqbal S, Muntner P, Batuman V, Rabito FA. Estimated burden of blood lead levels 5 microg/dl in 1999-2002 and declines from 1988 to 1994. *Environ Res.* 2008; 107(3):305-11.

Ireland MP. Lead retention in toads *Xenopus laevis* fed increasing levels of lead-contaminated earthworms. *Environmental Pollution.* 1977; 12(2): 85-92.

Kehoe RA. Lead, alkyl compounds, in occupational health and safety. ILO, Geneva, 1983.

Kelada SN, Shelton E, Kaufmann RB, Khoury MJ. Delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2001;154(1):1-13.

King M, Ramachandran V. Lead. En: Kirk - Othmer. *Encyclopedia of chemical technology.* 4ta ed. New York, NY: John Wiley & Sons, 1995. p. 69-113.

Krishnan K, Andersen ME, Clewell HJ, Yang RSH. Physiologically based pharmacokinetic modelling of chemical mixtures. In: Yang RSH, ed. *Toxicology of chemical mixtures: case studies, mechanisms, and novel approaches.* San Diego, CA: Academic Press, 1994. p. 399-437

Kruse y Krüger. Ergebnisse einer Monitoring-studie zur verbreitung von Umweltkontaminanten in Fischen niedersächsischer Gewässer. *Lebensmittelchem. gerichtl. Chem.* 1986; 40:88-92.

Laborde A, Ben A, Tomasina F, González-San Martín R, Tortorella MN, Sponton F. Estudio epidemiológico de una población xpuesta laboralmente a plomo. *Rev Med Urug* 2006; 22: 287-292

Lane RE, Hunter D, Malcolm C, Williams MK, Hudson TGF, Browne RC, et al. Diagnosis of inorganic lead poisoning: a statement. *Br Med J.* 1968; 4(5629):501.

Lamola AA, Piomelli S, Poh-Fitzpatrick MG, Yamane T, Harber LC. Erythropoietic protoporphyria and lead intoxication: the molecular basis for difference in cutaneous photosensitivity. II. Different binding of erythrocyte protoporphyrin to hemoglobin. *J Clin Invest.* 1975; 56(6):1528-35.

Lee YH, Stuebing RB. Heavy metal contamination in the river toad, *Bufo juxtasper* (Inger), near a copper mine in East Malaysia. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1990; 45(2):272-9.

Leggett RW. An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. *Environ Health Perspect.* 1993; 101(7):598-616.

Ley N° 24051. Residuos Peligrosos. *Acta Toxicol Argent.* 1993; 1(2):16-43

Linder G, Grillitsch B. Ecotoxicology of metals. In: Ecotoxicology of amphibian and reptiles, p. 325-459, Sparling DW, Linder G, Bishop CA, eds, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, 2000.

Litman DA, Correia MA. L-tryptophan: a common denominator of biochemical and neurological events of acute hepatic porphyria? *Science*. 1983;222(4627):1031-3.

Lloyd RD, Mays CW, Atherton DR, Bruenger FW. 210Pb studies in beagles. *Health Phys*. 1975; 28(5):575-83.

Locktich G. Perspectives on Lead toxicity. *Clin Biochem*. 1993;26:371-81

Lopez CM, Piñeiro AE, Pongelli V, Villaamil Lepori EC, Roses OE. Valores referenciales de plumbemia en el área de Buenos Aires. Población adulta sana no expuesta laboralmente. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2005;39(4):453-8.

Loumbourdis NS. Liver histopathologic alterations in the frog *Rana ridibunda* from a small river of Northern Greece. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2007;53(3):418-25.

Luckey TD, Venugopal B. Metal toxicity in mammals. Physiologic and chemical basis for metal toxicity. New York: Plenum Press, 1977.

Ma W. Lead in mammals. Environmental contaminants in wildlife, interpreting tissue concentrations. A special publication of SETAC. New York, USA: Lewis publishers. 1996; 281-296

Madsen HH, Skjødt T, Jørgensen PJ, Grandjean P. Blood lead levels in patients with lead shot retained in the appendix. *Acta Radiol*. 1988;29(6):745-6.

Mahaffey KR. Environmental lead toxicity: nutrition as a component of intervention. *Environ Health Perspect*. 1990;89:75-8.

Marcus AH. Multicompartment kinetic models for lead. II. Linear kinetics and variable absorption in humans without excessive lead exposures. *Environ Res*. 1985;36(2):459-72.

Martínez Riera N, Soria N, Feldman G, Riera N. Niveles de Plumbemia y otros marcadores, en niños expuestos a una fundición de plomo en Lastenia, Tucumán, Argentina. RETEL, Revista de toxicología en línea. SERTOX. 2003. [Acceso abril de 2013]. Disponible en <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

Mateo Floria, P. Gestión de la higiene industrial en la empresa. 7ª Edición. Madrid: Fundación Confmetal, 2007.

Molina L, Di Bernardo ML, Rondón C, García MY, Carrero P, Luna JR, Salazar JG, Morales A, Hernández Y, Peña J. Determinación y estandarización de plomo en sangre en operarios de estaciones de servicio del Estado Mérida. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 2007; 41 (2): 229-36

Morera D, MacKenzie SA. Is there a direct role for erythrocytes in the immune response? *Veterinary Research*. 2011; 42:89-96.

Mouchet F, Cren S, Cunienq C, Deydier E, Guilet R, Gauthier L. Assessment of lead ecotoxicity in water using the amphibian larvae (*Xenopus leavis*) and preliminary study of its immobilization in meat and bone meal combustion residues. *BioMetals*. 2007; 20:113-127.

Moyer T, Burritt M y Buzz J. Toxic Metals. En: Tietz. Clinical guide to laboratory test. St. Louis, Mo.: Saunders/Elsevier. 2006; Cap 35, p. 1371-1390.

Murozomi M, Chow TJ, Patterson CC, Chemical concentrations of pollutant lead aerosols, terrestrial dusts and sea salts in Greenland and Antarctic snow strata, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1969; 33:1247-94.

Mushak P, Davis JM, Crocetti AF, Grand LD. Prenatal and postnatal effects of low-level lead exposure; integrated summary of a report to the US Congress on childhood lead poisoning. *Environ Res*. 1989; 50:11-36

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference and Selected Procedures for Quantitative Determination of Hemoglobin in Blood: Approved Standard - 2^a ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Pennsylvania, 1994. NCCLS Document: H12-A4(6).

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards Determination of serum iron, total iron binding capacity and percent transferrin saturation; approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Pennsylvania, 1998. NCCLS Document: H17-A.

Niethammer KR, Atkinson RD, Baskett TS, Samson FB. Metals in riparian wildlife of the lead mining district of southeastern Missouri. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1985; 14: 213-223.

NRC. National Research Council. Measuring lead exposure in infant, children, and other sensitive population. National Research Council. Committee on Measuring Lead in Critical Populations, Board on Environmental Studies and Toxicology, Commission on Life Sciences: Washington D.C.: National Academy Press, 1993.

NTP. National Toxicology Program. Lead (CAS N° 7439-92-1). Reasonably anticipated to be carcinogens. First Listed in the Eleventh Report on Carcinogens. National Toxicology Program. Department of Health and Human Services, 2004.

Needleman HL, Gatsonis CA. Low-level lead exposure and the IQ of children. A meta-analysis of modern studies. *JAMA*. 1990; 263(5):673-8.

Needleman HL. Behavioral toxicology. *Environ Health Perspect*. 1995; 103(6):77-9.

NIOSH. National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH pocket guide to Chemicals hazards. Atlanta, GA: National Institute for Occupational Safety and Health, 2005.

Nogué Xarau S. Toxicología. En: Farreras Rozman. Medicina Interna. Volumen 2. Madrid: Elsevier, 1999. Cap.18. p. 2585-2619.

Nordberg GF, Mahaffey KR, Fowler BA. International workshop on lead in bone: implications for dosimetry and toxicology. Environ Health Perspect. 1991; 91:3-7.

Nordenson I, Beckman G, Beckman L, Nordström S. Occupational and environmental risks in and around a smelter in northern Sweden. IV. Chromosomal aberrations in workers exposed to lead. Hereditas. 1978; 88(2):263-7.

O'Flaherty E. Modeling: An introduction. Pharmacokinetics in risk assessment. Drinking water and health. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency, 1987;8:27-35.

O'Flaherty EJ. Physiologically based models for bone-seeking elements. III. Human skeletal and bone growth. Toxicol Appl Pharmacol. 1991; 111(2):332-41.

O'Flaherty EJ. Physiologically based models for bone-seeking elements. IV. Kinetics of lead disposition in humans. Toxicol Appl Pharmacol. 1993; 118(1):16-29.

O'Flaherty EJ. Physiologically based models for bone-seeking elements. V. Lead absorption and disposition in childhood. Toxicol Appl Pharmacol. 1995; 131(2):297-308.

O'Flaherty EJ, Inskip MJ, Franklin CA, Durbin PW, Manton WI, Bacchanale CL. Evaluation and modification of a physiologically based model of lead kinetics using data from a sequential isotope study in cynomolgus monkeys. Toxicol Appl Pharmacol. 1998; 149(1):1-16.

OMS. Métodos de Evaluación de Riesgos para la Salud Generados por la Exposición a Sustancias Peligrosas Liberadas por Rellenos Sanitarios. Informe de la Reunión de la OMS, Lodz, Polonia, 10-12 abril de 2000. EUT/00/5026441 (OPS/CEPIS); 2001.

OPS/OMS. CIE10 Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud. 10^{ma} revisión. OPS/OMS, 2010. [Acceso octubre de 2012]. Disponible en www.paho.org.

Ordóñez BR, Ruiz L, Mora R. Investigación epidemiológica sobre niveles de plomo en la población infantil y en el medioambiente domiciliario de Ciudad Juárez, Chihuahua, en relación con una fundición de El Paso, Texas. Salud Pública de México. 2003; 45(2):81-295.

Osatinsky R. Mecanismo de regulación del metabolismo del hierro. Bioqím Patol Clín. 2004; 68(1):13-24.

OSHA. Occupational safety and Health standards. Limits for air contaminants. Occupational safety and Health standards. Washington, DC: Occupational Safety and Health Administration, 2005.

Padilla Mangunazelaia A, Rodriguez-Sierra N, Martinez Castillo A. Plomo. Protocolos de vigilancia sanitaria específica. Sesión plenaria del consejo interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 1999.

Paglia DE, Valentine WN, Dahlgren JG. Effects of low-level lead exposure on pyrimidine 5'-nucleotidase and other erythrocyte enzymes. Possible role of pyrimidine 5'-nucleotidase in the pathogenesis of lead-induced anemia. *J Clin Invest.* 1975; 56(5):1164-9.

Pain DJ. Lead in waterfowl. Environmental contaminants in wildlife, interpreting tissue concentrations. A special publication of SETAC. New York, USA: Lewis publishers. 1996; 251-264.

Palavecino PM, García GF. Sobre la batracofauna de la ciudad de Salta y alrededores (Salta, Argentina): estudios puntuales y datos de colección. *Bol Soc Herpetol Mex.* 2008; 16(2):27-35.

Patterson CC. Contaminated and natural lead environments of man. *Arch Environ Health.* 1965; 11:344-60.

Peña CE, Carter DE, Ayala-Fierro F. Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Arizona USA: Southwest Hazardous Waste Program, University of Arizona, 2011. [Acceso Febrero de 2013]. Disponible en: <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>.

Perí SI, Arrieta MA, Fink NE, Salibián A. Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) activity in blood of *Bufo arenarum* (Anura). *Biol Res.* 1998a; 31(4):339-42.

Perí SI, Fink NE, Salibian A. Hematological parameters in *Bufo Arenarum* injected with sublethal dose of Pb acetate. *Biomed Environ Sci.* 1998b; 11:70-74.

Pintado Cros, T; Perez Sanchez, A; Escudero Soto, A; Mayayo Crespo, M. Fisiopatología del metabolismo del hierro. *Medicine* 2001; 8 (51): 2669-2675.

Piola JC, Ezpeleta DC. Valoración de marcadores de exposición al plomo en diagnóstico y vigilancia. *Revista de la Sociedad de Medicina Legal de Rosario.* 1998; 7(7):2-4.

Piola JC, Prada DB. Intoxicaciones laborales por plomo atendidas en Rosario, 1990-1998. *Acta Toxicológica Argentina.* 1998; 6(2): 51-52

Piomelli S. A micromethod for free erythrocyte porphyrins: the FEP test. *J Lab Clin Med.* 1973; 81(6):932-40.

Piomelli S, Corash L, Corash MB, Seaman C, Mushak P, Glover B, et al. Blood lead concentrations in a remote Himalayan population. *Science.* 1980; 210(4474):1135-7.

Piomelli S, Seaman C, Zullo D, Curran A, Davidow B. Threshold for lead damage to heme synthesis in urban children. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(10):3335-9.

Piomelli S, Seaman C, Kapoor S. Lead-induced abnormalities of porphyrin metabolism. The relationship with iron deficiency. *Ann N Y Acad Sci*. 1987; 514:278-88.

Piomelli, S. Lead Poisoning. En: Nathan DG and Oski FA. *A hematology of infancy and childhood*. 6^{ta} Ed. Philadelphia: Saunders, 2003. Cap 13:480-496.

Ponka P. Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood*. 1997; 89(1):1-25.

Porru S, Alessio L. The use of chelating agents in occupational lead poisoning. *Occup Med (Lond)*. 1996; 46(1):41-8.

Porta A. Expresión de biomarcadores de contaminación ambiental en organismos acuáticos bonaerenses. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2001; 35(2):261-71.

PRECOTOX. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones. Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico HACRE: Módulo de Capacitación. García, Susana Isabel - 1a ed. - Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones. 2011.

PRECOTOX. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones. Guía de Prevención, Diagnóstico, Tratamiento y Vigilancia Epidemiológica de las Intoxicaciones Ambientales Infantiles con Plomo. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones. 2013.

Rabinowitz MB, Wetherill GW, Kopple JD. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest*. 1976; 58(2):260-70.

Rabinowitz MB. Historical Perspective on Lead Biokinetic Models. *Environmental Health Perspectives*. 1998;106 (6): 1461-65

Rice TM, Oris JT, Taylor DH. Toxicokinetics, available source, and route of entry of lead in fed and food-deprived bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2001; 41(4):450-7.

Rice TM, Oris JT, Taylor DH. Effects on growth and changes in organ distribution of bullfrog larvae exposed to lead throughout metamorphosis. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2002; 68(1):8-17.

Ricós C. Sociedad Española de Química clínica y Patología Molecular. SEQC. Comité de Garantía de la Calidad y Acreditación de Laboratorios. Comisión de Calidad Analítica. Tabla de Variación Biológica - especificaciones deseables. [Acceso febrero de 2010]. Disponible en www.westgard.com.

Rodak, F. *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*. 2a ed. Buenos Aires: Panamericana, 2005.

Rodríguez A, Espinel G. Niveles de plomo en sangre y factores de riesgo asociados en niños de 2 a 10 años en el barrio villa Francisca, Santo Domingo, República Dominicana. *Ciencia y Sociedad*. 2008; XXXIII(4):595-609.

Rogival D, Scheirs J, de Coen W, Verhagen R, Blust R. Metal blood levels and hematological characteristics in wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) along a metal pollution gradient. *Environ Toxicol Chem*. 2006; 25:149-57

Ronco A, Porta A, Roca A. Las aguas del río Santiago. Otro caso de contaminación urbano-industrial. *Ciencia Hoy*. 1992; 4:34-38.

Ronco A. Impacto de plaguicidas en ambientes acuáticos pampeanos: Integración de estudios químico ecotoxicológicos en experimentos de campo y laboratorio, con especial énfasis al caso del glifosato. En: Camino M, Aparicio V. Aspectos ambientales del uso del Glifosato. Balcarce: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2010. p. 85-94.

Romieu I, Lacasana M, McConnell R. Lead exposure in Latin America and the Caribbean. Lead Research Group of the Pan-American Health Organization. *Environ Health Perspect*. 1997; 105(4):398-405.

Rosenberg CE, Perí SI, Arrieta MA, Fink NE, Salibián A. Red blood cell osmotic fragility in *Bufo arenarum* exposed to Pb. *Arch Physiol Biochem*. 1998; 106:1-6.

Rosenberg CE, Fink NE, Arrieta MA, Salibián A. Effect of lead acetate on the in vitro engulfment and killing capability of toad (*Bufo arenarum*) neutrophils. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2003; 136(3):225-33.

Rosin A. The long-term consequences of exposure to lead. *Isr Med Assoc J*. 2009; 11(11):689-94.

Rowland AS, McKinstry RC. Lead toxicity, white matter lesions, and aging. *Neurology*. 2006; 66(10):1464-5.

Ruiz-Gil W. Pica: Un enigma aún por resolver. *Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*. 2001; 14(3). [Acceso Febrero de 2013]. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/spmi/v14n3/pica.htm>

Saint-Laurent D, Hähni M, Saint-Laurent J, Baril F. Comparative assessment of soil contamination by lead and heavy metals in riparian and agricultural areas (southern Québec, Canada). *Int J Environ Res Public Health*. 2010; 7(8)

Sandoval, MT, Pérez-Coll C, Herkovits, J. Teratogénesis y alteración del desarrollo de embriones de *Bufo arenarum* por exposición al plomo. 2004 Universidad Nacional del Noreste. Comunicaciones científicas y tecnológicas, 2004. Resumen B-030. [Acceso noviembre 2013]. Disponible en la página web: www.unne.edu.ar

Sanín LH, González T, Romieu I, Hernández M. Acumulación de plomo en hueso y sus efectos en la salud. *Salud Pública de México*. 1998; 40(4):359-68.

Sakai T, Yanagihara S, Kunugi Y, Ushio K. Relationships between distribution of lead in erythrocytes in vivo and in vitro and inhibition of ALA-D. *Br J Ind Med.* 1982; 39(4):382-7.

Sassa S. Toxic effects of lead, with particular reference to porphirin and heme metabolism. En: De Matteis F, Aldridge W (eds): *Handbook of Experimental Pharmacology.* Berlin: Springer-Verlag, 1973; 44: p. 333.

Schuhmacher M, Paternain JL, Domingo JL, Corbella J. An assessment of some biomonitoring indicators of occupational exposure to lead. *Trace Elements and Electrolytes.* 1997; 14(3):145-49.

Schwanitz G, Lehnert G, Gebhart E.. Chromosome damage after occupational exposure to lead. *Dtsch Med Wochenschr.* 1970; 95(32):1636-41.

Schwartz J, Landrigan PJ, Baker EL Jr, Orenstein WA, von Lindern IH. Lead-induced anemia: dose-response relationships and evidence for a threshold. *Am J Public Health.* 1990; 80(2):165-8.

Schwartz J. Lead, blood pressure, and cardiovascular disease in men and women. *Environ Health Perspect.* 1991; 91: 71-75.

Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 2005; 122:789-801.

Shy CM. Lead in petrol: the mistake of the XXth century. *World health statist. Quart.* 1990; 43:168- 176

Six KM, Goyer RA. The influence of iron deficiency on tissue content and toxicity of ingested lead in the rat. *J Lab Clin Med.* 1972; 79(1):128-36.

Smith GR. Lead. *U.S. Geological survey minerals yearbook.* 2000.

Soria ML, Repetto G, Repetto M. Revisión general de la toxicología de los metales. En: Repetto M. *Toxicología Avanzada.* Madrid: Ediciones Díaz de Santos 1995. Cap. 8. p. 293-358.

Sotomayor V. Efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la expresión génica de embriones de *Rhinella arenarum*. Mecanismos de acción y vías de señalización. Tesis Doctoral. Buenos Aires: UBA, 2011.

Stansley W, Roscoe DE. The uptake and effects of lead in small mammals and frogs at a trap and skeet range. *Arch Environ. Contam toxicol.* 1996; 30:220-226

Stewart WF, Schwartz BS, Davatzikos C, Shen D, Liu D, Wu X, et al. Past adult lead exposure is linked to neurodegeneration measured by brain MRI. *Neurology.* 2006; 66(10):1476-84.

Strömberg U, Schütz A, Skerfving S. Substantial decrease of blood lead in Swedish children, 1978-94, associated with petrol lead. *Occup Environ Med.* 1995; 52(11):764-9.

Strömberg U, Lundh T, Schütz A, Skerfving S. Yearly measurements of blood lead in Swedish children since 1978: an update focusing on the petrol lead free period 1995-2001. *Occup Environ Med.* 2003; 60(5):370-2.

Strömberg U, Lundh T, Skerfving S. Yearly measurements of blood lead in Swedish children since 1978: the declining trend continues in the petrol-lead-free period 1995-2007. *Environ Res.* 2008; 107(3):332-5.

Sures B, Taraschewski H, Jackwerth E. Lead content in eels and two parasites. *Diseases of aquatic organisms.* 1994; 19:105-107

Sztrum, AA. Susceptibilidad diferencial al níquel en distintos estadios del desarrollo embrio-larval de *Rhinella (Bufo) arenarum*. Tesis Doctoral. Buenos Aires: UBA, 2010.

Takebayashi T, Omae K, Hosoda K, Satoh T, Hamaguchi T, Sakurai H. Evaluation of δ -aminolevulinic acid in blood of workers exposed to lead. *Br J Ind Med.* 1993; 50:49-54.

Tian LT, Lei LJ, Chang XL, Jin TY, Zheng G, Guo WJ, Li HQ, Pan XH. Risk assessment of renal dysfunction caused by occupational lead exposure. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 2010; 28(3):170-4.

Tong S, von Schirnding YE, Prapamontol T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bull World Health Organ.* 2000; 78(9):1068-77.

Tsaih SW, Korrick S, Schwartz J, Amarasiriwardena C, Aro A, Sparrow D, et al. Lead, diabetes, hypertension, and renal function: the normative aging study. *Environ Health Perspect.* 2004; 112(11):1178-82.

Turlakiewicz Z, Chmielnicka T. Diethyllead as specific indicator of occupationally exposure. *Br. J. Industrial. Med.* 1985; 42: 682-685

U.S. EPA. Environmental Protection Agency. Guidance manual for the integrated exposure uptake biokinetic model for lead in children. Washington DC: Environmental Protection Agency, 1994. Publicación N° 9285.7-15-1

U.S. EPA. Environmental Protection Agency. EPA probit analysis program, versión 1.5. Washington DC: Environmental Protection Agency, 2001. [Acceso Febrero de 2013]. Disponible en: www.epa.gov

U.S. EPA. Environmental protection Agency. Lead in drinking water. Washington DC: Environmental Protection Agency, 2005a. [Acceso Febrero de 2013]. Disponible en: <http://water.epa.gov/drink/info/lead/index.cfm>

U.S. EPA. Environmental Protection Agency. Designated as hazardous substances in accordance with section 311 (b)(2)(A) of the Clean Water Act. Washington DC:

Environmental Protection Agency, 2005b. [Acceso junio de 2010] Disponible en www.epa.gov

Valdivia Infantas M. Intoxicación por plomo. Rev Soc Per Med Inter. 2005; 18(1):22-7

Varela ME, Sellares ME. Sobre la Morfología hemática de *Bufo arenarum* (Hensel). Rev Soc Argent Biol. 1937; 13:345-9.

Valentine WN, Fink K, Paglia DE, Harris SR, Adams WS. Hereditary hemolytic anemia with human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. J Clin Invest. 1974; 54(4):866-79.

Vázquez F. Toxicidad Comparada de Zinc, Plomo y Mercurio para Zoea I de *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura). Tesina. Buenos Aires: Universidad de Belgrano, 2005

Ventimiglia F, Salibián A, Fink NE. Parámetros hemáticos de Trabajadores expuestos al plomo. Acta Toxicol Argent. 2003; 11(2):102

Ventimiglia FD, Bruzzone L, Salibián A, Fink NE. Biosensores hematológicos de exposición y efecto en trabajadores expuestos al plomo. Acta Toxicol Argent. 2004; 12: 36.

Ventimiglia F, Mauleón L, Fink NE y Salibián A. Ferremia: ¿Biomarcador de exposición humana al Pb? 67° Congreso Argentino de Bioquímica. Ciudad de Buenos Aires. 10 al 13 de Octubre de 2006.

Ventimiglia F, Mauleón L, Bruzzone L, Fink NE, Salibián A. Ferremia: ¿Biomarcador de exposición humana al plomo? Bioquímica y Patología clínica. 2007; 71(1):67-70

Ventimiglia F, Apartin C, Fink NE. Análisis de la distribución del plomo en diferentes compartimentos en un modelo experimental de anfibio (*Rhinella arenarum*). Congreso CUBRA X, Ciudad de Mar del Plata. 11 al 14 de Noviembre de 2009.

Viarengo A, Mancinelli G, Martino G, Pertica M, Canesi L, Mazzucotelli A. Integrated cellular stress indices in trace metal contamination: critical evaluation in a field study. Mar Ecol Prog Ser. 1988; 46:65-70.

Vivante A, Hirshoren N, Shochat T, Merkel D. Association between Acute Lead Exposure in Indoor Firing Ranges and Iron Metabolism. IMAJ 2008; 10:292–295.

Vives Corrons JL. Anemias Hemolíticas. En Sans-Sabrafén. Hematología Clínica. Madrid: Elsevier, 2001. Cap 5:105-130

Vives Corrons JL. Anemia ferropénica y otros trastornos del metabolismo de hierro. En: Sans Sabrafén J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL. Hematología Clínica. Madrid: Elsevier, 2001. Cap. 6: 127-164.

Vives Corrons JL, Aguilar Bascompte JL. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. Barcelona: Masson, 2006.

Vural N, Duydu Y. Biological monitoring of lead in workers exposed to tetraethyllead. *Sci Total Environ.* 1995; 171:183-7.

Vural N, Duydu Y. Urinary excretion of lead and δ -Aminolevulinic acid in workers occupationally exposed to tetraethyl lead. *Biological trace element research.* 1998, 63; 185-194

Wang MZ, Jia XY. Low levels of lead exposure induce oxidative damage and DNA damage in the testes of the frog *Rana nigromaculata*. *Ecotoxicology.* 2009; 18(1):94-9.

Wayland M, Neugebauer E, Bollinger T. Concentrations of lead in liver, kidney and bone of bald and golden eagles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1999; 37:267-272.

White PD, Van Leeuwen P, Davis BD. The conceptual structure of integrated exposure uptake biokinetic model for lead in children. *Environ Health Perspect.* 1998; 106: 1513-1530.

WHO. Inorganic lead. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1995. Serie 165. [Acceso Febrero de 2013]. Disponible en: <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacg/e/cd-cagua/guias/b.parametros/4.BasTox/IPCS/076b.pdf>

Wilson Tabor, M. Plomo. En: Pesce-Kaplan. Química clínica. Métodos. Buenos Aires: Panamericana, 1990. Cap. 54: 407-418.

World Health Organization. Guidelines for drinking water quality, 2a ed. Ginebra: WHO, 1993. Vol 1.

Wright RO, Shannon MW, Wright RJ, Hu H. Association between iron deficiency and low-level lead poisoning in an urban primary care clinic. *Am J Public Health.* 1999; 89(7):1049-53.

Wright RO, Tsaih SW, Schwartz J, Wright RJ, Hu H. Association between iron deficiency and blood lead level in a longitudinal analysis of children followed in an urban primary care clinic. *J Pediatr.* 2003; 142(1):9-14.

Wu MT, Kelsey K, Schwartz J, Sparrow D, Weiss S, Hu H. A delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism may modify the relationship of low-level lead exposure to uricemia and renal function: the normative aging study. *Environ Health Perspect.* 2003; 111(3):335-41.

Zielhuis RL, del Castillo P, Herber RF, Wibowo AA. Levels of lead and other metals in human blood: suggestive relationships, determining factors. *Environ Health Perspect.* 1978 Aug; 25:103-9.

Anexo

En este Capítulo se describen los detalles técnicos de los métodos utilizados en el trabajo

1. Métodos para la determinación de parámetros hematológicos
 - a) Mediciones Hematológicas en un autoanalizador Coulter JT
 - b) Estado del Hierro en el Organismo
 - c) Frotis sanguíneo (búsqueda de punteado basófilo)

2. Métodos para la medida del perfil plúmbico
 - a) Plombemia
 - b) Plomburia
 - c) Plomo en tejidos

3. Métodos bioquímicos
 - a) Protoporfirina Eritrocitaria Libre
 - b) Actividad de la enzima δ -ALAD

4. Lavado del material de vidrio para las determinaciones de hierro y plomo.

1. Métodos para la determinación de parámetros hematológicos

a) Mediciones de parámetros hematológicos en un autoanalizador Coulter JT (Método Coulter WH, 1956).

Muestra: se utilizó sangre anticoagulada con EDTA

Conservación: hasta dos días en heladera

Procedimiento:

- 1) Los tubos con sangre anticoagulada con EDTA se colocaron en un agitador de rodillo durante 15 min.
- 2) Se agitaron los tubos por inversión entre 5 y 10 veces.
- 3) Se destaparon y se colocaron en la pipeta de aspiración de muestras.
- 4) Se apretó el botón con la leyenda "Whole blood".
- 5) El resultado que aparece en el monitor del equipo, se registra en un cuaderno destinado para tal fin.

Valores de referencia: se utilizaron los valores de OMS, (Dacie JV y Lewis SM, 2007)

b) Determinación de la concentración de hierro sérico (Método colorimétrico)

Muestra: suero

Conservación: en freezer hasta 1 mes

Reactivos:

Fer color de Wiener- lab

Agua bidestilada

Todo el material de vidrio fue lavado siguiendo el procedimiento detallado al final de este Anexo

Procedimiento:

- 1) Se prepararon dos tubos B (blanco) y S (estándar), con 200 ul de agua bidestilada y 200 ul de estándar, respectivamente, que se procesaron de forma similar a las muestras.
- 2) Se prepararon tubos de Kahn con 200 ul de suero.
- 3) A cada tubo se le agregó 1 ml del reactivo buffer reductor.
- 4) Se leyó la absorbancia a 560 nm de los tubos con suero para determinar el Blanco de suero.
- 5) Se agregó a todos los tubos 200 ul del reactivo cromógeno.
- 6) Incubar 5 min a temperatura ambiente.
- 7) Se midió la absorbancia a 560 nm.

Valores de referencia en humanos: 60-160 $\mu\text{g dl}^{-1}$ (Laboratorio Wiener Lab)

c) Estudio del frotis sanguíneo (Vives-Corróns JL, Aguilar Bascompte JL, 2006)

Muestra: sangre sin anticoagulante

Conservación: hasta 24 hs. sin fijar

Reactivos:

Solución de May Grunwald (metanol, Eosinato de azul de metileno)

Solución de Giemsa (Azur II, Eosina)

Buffer fosfato (pH 6,8)

Procedimiento:

- 1) Se colocó una gota de la sangre recién extraída sobre un portaobjetos.
- 2) Con un extensor se realizó el frotis sanguíneo.
- 3) Se fijó con la solución de May Grunwald durante 3 min.
- 4) Se lavó con agua de canilla
- 5) Se cubrieron los extendidos con buffer fosfato de pH 6,8 durante 3 min.
- 6) Se lavó con agua de canilla.
- 7) Se cubrieron los frotis sanguíneos con solución de Giemsa, durante 10 min.
- 8) Se lavó con agua de canilla y se secó a temperatura ambiente.
- 9) Se observó la morfología sanguínea con microscopio, utilizando objetivo de inmersión (100X).

Valores de referencia en humanos: los glóbulos rojos de los individuos sanos no presentan inclusiones. Estas sí son características de la intoxicación con plomo (punteado basófilo).

2. Métodos para la medida del perfil plúmbico

a. Plombemia

b. Plomburia

c. Plomo en tejidos

Procedimiento:

1. Se colocó una cantidad medida de muestra en un tubo de ensayo:
 - a. Sangre heparinizada de sapos (150-500 ul) y en el caso de humanos (500 ul),
 - b. 1ml de orina (ambos grupos, sapos y humanos) y
 - c. tejidos debieron primeramente llevarse a peso seco en estufa (a 100 °C), luego se tomó una porción pesada de la misma.
2. Se agregó 1ml de HNO₃ concentrado de buena calidad y se tapó los tubos que se incubaron en baño entre 60- 70 °C, donde ocurrió la digestión por destrucción de materia orgánica. Al obtener una solución límpida se dio por concluida la digestión.

3. Posteriormente se filtró en papel (Whatman nº 1) y luego con filtros MSI de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,45 µm.
4. La medida de plomo se obtuvo por espectrofotometría de absorción atómica (Varian Spectra AA 300), por absorción directa en llama de aire-acetileno. La curva de calibración se realizó agregando solución de nitrato de Pb a muestras control con la misma matriz de las muestras experimentales, siguiendo las especificaciones de APHA-AWWA-WPCF (Clesceri y col., 1998). El límite de detección fue 0,1 mg/dl y los resultados se expresaron en mg/dl de sangre y µg/g de peso seco del órgano.

3. Métodos bioquímicos

a) Protoporfirina Eritrocitaria Libre

b) Actividad de la enzima δ-ALAD

a) Determinación de la concentración de PEL (método de Piomelli, 1973)

Muestra: sangre con EDTA

Conservación: hasta tres días en heladera y ocho semanas en tierra de diatomeas (celite)

Reactivos:

Celite al 5% en Solución fisiológica de ClNa

AcEt/AcH (proporción 4:1)

HCl de concentración 1,5 N

Solución fisiológica ClNa de concentración 9 g/l

Procedimiento:

- 1) En un tubo de Kahn se colocó 20 ul de sangre entera y agregó 100 ul de tierra de diatomeas al 5%. Se prepararon blancos con 20 ul de solución fisiológica. Las muestras se procesaron por duplicado.
- 2) Se agitó las muestras en un agitador vórtex 10 segundos
- 3) Se agregó 2 ml de Ac Et/Ac H (4:1)
- 4) Se agitaron los tubos en vórtex 10 seg. Inmediatamente antes de procesar otra muestra.
- 5) Se centrifugó por 30 seg. a velocidad media (1500 rpm)
- 6) Se transvasó el sobrenadante a tubos de hemólisis
- 7) Se agregó 2 ml de HCl (1,5 N)
- 8) Se agitaron las muestras en vórtex 10 seg.
- 9) Con pipetas Pasteur de vidrio se tomó de la fase clorhídrica (inferior) y se leyó en espectrofluorómetro, Aminco-Bowman SPF equipado con fuente de excitación de xenón de 150 W con espejo condensador elipsoidal y con fotomultiplicador Hamamatsu R928, a 405 nm

Valores de referencia utilizados: (Piomelli S, 1973)

22-87 ug /100 ml de sangre

b) Determinación de la actividad de la δ -ALAD en sangre. (Berlin y Schaller, 1974, adaptado por Perí et al, 1998).

Muestra: sangre entera heparinizada

Conservación: a 4°C, hasta 24 horas de tomada la muestra

Reactivos:

Reactivo sustrato (ALA), marca Sigma

Reactivo de Erlich

Acido tricloroacético al 10%

Solución Buffer pH 5,4

Procedimientos:

- a) En sapos se tomaron alícuotas 75 μ l de sangre heparinizada, por duplicado. Se agregó 1,3ml de agua y 1ml del reactivo Buffer/sustrato de modo que el pH del medio de la reacción se ajusto a 5,4.
- b) Se incubó a 38°C durante una hora y posteriormente, se detuvo la reacción con ácido tricloroacético al 10 %.
- c) En humanos, se procedió de idéntica manera excepto que el volumen de muestra utilizada fue de 0,2 ml y el pH de la reacción fue de 6,4.
- d) Se midió la absorbancia de las muestras a 555 nm, en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu modelo 1603 (Kyoto, Japón), 10 min. después del agregado del reactivo de Ehrlich. La actividad de la enzima presente en las muestras se expresó en U l⁻¹ de eritrocitos

Valores de referencia utilizados:

García Fernandez JC et al. (1989): > 20 U l⁻¹ de GR

Perí S et al. (1998): 72,98-236,33 U l⁻¹ de GR

4. Lavado del material de vidrio para la determinación de hierro y plomo

- a) Se lavó con detergente no iónico y enjuagó con abundante agua de canilla.
- b) Se cubrió el material en HNO₃ al 50%, durante 24 hs
- c) Se enjuagó 3 veces con H₂O destilada y sumergir en esta hasta el día siguiente
- d) Se enjuagó 3 veces con H₂O bidestilada y sumergió en esta hasta el día siguiente
- e) Se enjuagó con agua nanopura: agua destilada desionizada Nanopura MiliQ (concentración de Pb < 0,006 mg.l⁻¹).
- f) Se secó en estufa a 50-100 °C