



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

## Alteración de la función endocrina testicular por efecto del plomo inorgánico

Miguel Rodamilans Pérez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



**ALTERACION DE LA FUNCION ENDOCRINA  
TESTICULAR POR EFECTO DEL PLOMO INORGANICO**

**Departamento de Salud Pública y Legislación Sanitaria  
Area de conocimiento de Toxicología y Legislación  
Sanitaria**

**Director: Jacint Corbella Corbella**

Memoria presentada por  
**Miguel Rodamilans Pérez**  
para aspirar al grado de Doctor en Biología  
Barcelona, Enero de 1988

**FACULTAD DE BIOLOGIA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700182799

## **AGRADECIMIENTOS**

Al profesor J. Corbella, por haber aceptado la dirección de esta tesis y por el estímulo constante para su realización .

Al Dr. E. Vilardell del Servicio de Endocrinología por la valoración clínica efectuada de la población laboral expuesta.

A las Dras. F. Rivera y M<sup>a</sup>. J. Martínez -Osaba y a la Srta. P. Perez del Laboratorio Hormonal por la supervisión y colaboración en la realización de las técnicas hormonales.

A mis compañeros Drs. J.M<sup>a</sup>. Marqués, J. To, M. Torra, M. Brunet, A. Guevara y a la Srta. A. Laporte, por la ayuda prestada y su espíritu de colaboración a lo largo de este estudio.

A la Escuela Profesional de Medicina del Trabajo por el soporte económico del estudio en población laboral expuesta y del diseño experimental.

A mi hija Tania por la tolerancia y respeto mostrados en los últimos meses de la redacción de esta tesis.

A la Dra. M<sup>a</sup>. J. Puig por la colaboración prestada en el estudio estadístico de los resultados de esta tesis.

Finalmente y muy especialmente, a los trabajadores del ramo metalúrgico y sus representantes sindicales, que me han iniciado y estimulado para seguir trabajando e investigando en el apasionante campo de la Toxicología Laboral, así como por la colaboración prestada, sin la cual hubiese sido imposible la realización de esta tesis.

## INDICE

	Pag.
<b>1. INTRODUCCION</b>	1
<b>1.1. Antecedentes</b>	2
<b>1.2. Prólogo histórico</b>	5
1.2.1. Utilización del plomo.	5
1.2.2. Patología por plomo.	6
1.2.2.1. El camino de las adulteraciones.	
La vía alimentaria.	6
1.2.2.2. El camino de la exposición laboral.	8
1.2.2.3. La obra del Dr Vicente Mitjavila.	9
1.2.2.4. Alteraciones de la función testicular.	14
<b>1.3. Ciclo biológico del plomo.</b>	16
1.3.1. Exposición ambiental.	21
<b>1.4. Cinética del plomo en el organismo.</b>	27
1.4.1. Antecedentes históricos.	27
1.4.2. Exposición laboral.	27
1.4.2.1. Almacenamiento de plomo en los huesos.	27
1.4.2.2. Excreción de plomo.	29
1.4.2.3. Plomo en sangre.	29
1.4.2.4. Modelos compartimentales.	30
<b>1.5. Biosíntesis del hemo.</b>	36
1.5.1. La Cinc-Protoporfirina IX y la actividad $\delta$ -aminolevulinato deshidratasa.	37
<b>1.6. Síntesis de Esteroides.</b>	42
<b>1.7. Andrógenos.</b>	46
1.7.1. Acción fisiológica.	46
1.7.2. Estructura esteroidea y androgenicidad.	47



1.7.3. Biosíntesis.	48
1.7.4. Origen de los andrógenos plasmáticos en el hombre adulto.	51
1.7.5. Transporte plasmático de andrógenos.	53
<b>1.8. Mecanismos de regulación del eje hipotálamo - hipófiso - testicular.</b>	54
<b>1.9. Valoración de la función endocrina testicular</b>	56
<b>1.10. Efecto del plomo sobre la función endocrina testicular.</b>	57
<b>2. OBJETIVOS.</b>	60
2.1. En población laboral expuesta.	63
2.2. En animales de experimentación.	66
<b>3. MATERIAL Y METODOS.</b>	68
3.1.1. Descripción del estudio en población laboral expuesta.	69
3.1.1.1. Población estudiada.	69
3.1.1.2. Obtención de muestras.	69
3.1.2. Descripción del modelo experimental.	71
3.1.2.1. Duración del ensayo.	71
3.1.2.2. Grupo expuesto.	73
3.1.2.3. Grupo control	73
3.1.2.4. Obtención de muestras.	73
3.1.2.5. Procedimiento analítico.	73
3.2. <b>Espectrometría de Absorción Atómica.</b>	77
3.2.1. Plomo en sangre y tejidos.	77
3.2.2. Fundamento.	77
3.2.3. Procedimiento analítico.	78
3.2.4. Corrección de fondo.	78
3.2.5. Cálculos.	78

3.2.6. Programa de atomización.	79
3.2.7. Preparación de las muestras de tejidos.	80
3.2.8. Preparación de las muestras de sangre.	81
<b>3.3. Determinación de Cinc-Protoporfirina IX.</b>	<b>82</b>
3.3.1. Realización de las curvas de calibración.	82
3.3.2. Preparación de las muestras.	82
3.3.3. Condiciones analíticas.	83
3.3.4. Sensibilidad del método.	83
3.3.5. Cálculos.	83
<b>3.4. Actividad <math>\delta</math>- Aminolevulinato deshidratasa.</b>	<b>85</b>
3.4.1. Reactivos.	85
3.4.2. Preparación de la muestra.	85
3.4.3. Cálculos.	86
<b>3.5. Análisis competitivo.</b>	<b>87</b>
3.5.1. Radioinmunoensayo.	89
3.5.1.1. Requerimientos.	89
3.5.1.2. Antígenos marcados.	91
3.5.1.3. Métodos hormonales.	91
3.5.1.3.1. Testosterona.	91
3.5.1.3.2. SBG.	92
3.5.1.3.3. LH.	92
3.5.1.3.4. FSH.	92
3.5.1.3.5. Cortisol.	92
3.5.1.3.6. DHA-S	93
3.5.1.4. Via $\Delta 4$	93
3.5.1.4.1. Progesterona.	93
3.5.1.4.2. 17-Hidroxiprogesterona.	94
3.5.1.4.3. Cromatografía en columna.	94
3.5.1.4.4. Androstendiona.	95
3.5.1.4.5. Testosterona.	96

3.5.1.5. Preparación viales de centelleo	96
3.5.1.6. Contaje.	96
3.5.1.7. Cálculo.	96
3.6. <b>Análisis estadístico.</b>	98
<b>4. RESULTADOS.</b>	100
4.1. <b>Metodológicos.</b>	101
4.1.1. Control de calidad.	101
4.1.1.1. Plomo en sangre	101
4.1.1.2. Cinc- Protoporfirina.	101
4.1.1.3. Parámetros hormonales.	101
4.2. <b>En población laboral expuesta.</b>	103
4.2.1. Marcadores biológicos de exposición laboral.	103
4.2.2. Parámetros suprarrenales.	104
4.2.3. Parámetros del eje Hipotálamo-hipófiso -testicular	104
4.3. <b>En animales de experimentación.</b>	108
4.3.1. Pesos corporales.	111
4.3.2. Plomo en sangre.	111
4.3.3. Plomo en tejidos.	111
4.3.3.1. Plomo en riñón.	116
4.3.3.2. Plomo en hígado.	116
4.3.3.3. Plomo en hueso.	119
4.3.3.4. Plomo en cerebro.	119
4.3.3.5. Plomo en testículos.	122
4.3.4. Marcadores biológicos de exposición.	122
4.3.5. Parámetros hormonales de la vía $\Delta^4$ .	124
4.3.5.1. Progesterona.	124
4.3.5.2. 17-Hidroxiprogesterona.	124
4.3.5.3. Androstendiona.	124
4.3.5.4. Testosterona.	129

4.3.6. Índices de producción Producto final/ precursor.	129
4.3.6.1. 17-Hidroxiprogesterona / Progesterona.	129
4.3.6.2. Androstendiona / 17 Hidroxiprogesterona.	131
4.3.6.3. Testosterona / Androstendiona.	131
<b>5. DISCUSION.</b>	
<b>5.1. En población laboral expuesta.</b>	136
5.1.1. Plomo y ZPP intraeritrocitaria	137
5.1.2. Parámetros del eje hipófiso-testicular.	138
5.1.3. Hormonas suprarrenales.	141
<b>5.2. En animales de experimentación.</b>	142
5.2.1. Generales.	142
5.2.2. Plomo en tejidos.	142
5.2.3. Marcadores biológicos de exposición laboral en ratones tratados.	144
5.2.3.1. Cinc-Protoporfirina IX intraeritrocitaria.	144
5.2.3.2. $\delta$ -Aminolevulinato-deshidratasa.	144
5.2.4. Parámetros hormonales de la vía $\Delta 4$ .	144
5.2.4.1. Progesterona.	144
5.2.4.2. 17-Hidroxiprogesterona.	145
5.2.4.3. Androstendiona.	145
5.2.4.4. Testosterona.	146
<b>6. RESUMEN.</b>	148
<b>7. CONCLUSIONES.</b>	153
<b>8. BIBLIOGRAFIA.</b>	159

**NOMBRES COMUNES DE ESTEROIDES UTILIZADOS EN ESTA TESIS  
Y SUS CORRESPONDIENTES NOMBRES SISTEMATICOS.**

Androstendiona	Androst-4-eno-4,17-diona
Androstendiol	Androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol
Cortisol	Pregn-4-eno-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-3,20-diona
Dehidroepiandrosterona	Androst-5-eno-3 $\beta$ -ol-17-ona
Dehidroepiandrosterona sulfato	Androst-5-eno-3 $\beta$ -ol-17-ona-3 $\beta$ -Na-sulfato
5 $\alpha$ -Dihidrotestosterona	5 $\alpha$ -Androstano-17 $\beta$ -ol-3-ona
17 $\beta$ -Estradiol	Estra-1,3,5-trieno-3-ol-17-ona
17-Hidroxipregnenolona	Pregn-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol-20-ona
17-Hidroxiprogesterona	Pregn-4-eno-17 $\alpha$ -ol-3,20-diona
Pregnenolona	Pregn-5-eno-3 $\beta$ -ol-20-ona
Progesterona	Pregn-4-eno-3,20-diona
Testosterona	Androst-4-eno-17 $\beta$ -ol-3-ona

**ENZIMAS IMPLICADOS :**

**EC**

5-aminolevulinato sintetasa ( $\delta$ -aminolevulinato sintetasa )	2.3.1.37
Porfobilinógeno sintetasa ( $\delta$ -aminolevulinato deshidratasa )	4.2.1.24
Porfobilinógeno deaminasa.	4.3.1.8
Uroporfirinógeno decarboxilasa	4.1.1.37
Coproporfirinógeno oxidasa	1.3.3.3
Ferroquelatasa ( Hemosintetasa )	4.99.1.1
Colesterol monooxigenasa (sc) ( 20-22 dihidroxicolesterol desmolasa )	1.14.15.6
3 $\beta$ -Hidroxi- $\Delta$ 5-esteroide deshidrogenasa	1.1.1.145
Steroide 17 $\alpha$ -monooxigenasa ( 17 $\alpha$ hidroxilasa )	1.14.99.9
17 $\alpha$ -Hidroxiprogesterona aldolasa ( 17,20 liasa )	4.1.2.30
3(o 17 ) $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa	1.1.1.51

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

Adenosín monofosfato cíclico	AMPc
Androstendiona	A( $\Delta$ 4)
Porfobilinógeno sintetasa ( $\beta$ -aminolevulinato dehidratasa)	ALA-D
Cinc Protoporfirina IX intraeritrocitaria	ZPP
Gonadotrofina coriónica humana	hCG
Dehidroepiandrosterona	DHA
Dehidroepiandrosterona sulfato	DHA-S
5alfa-Dihidrotestosterona	DHT
17-Hidroxiprogesterona	17OH-P
Hormona foliculoestimulante	FSH
Hormona liberadora de Gonadotrofinas	GnRH
Hormona luteinizante	LH
Inhibina	Inh
Indice de Testosterona libre	ITL
Plomo	Pb
Progesterona	P
Proteína transportadora de esteroides sexuales	SBG
Protoporfirina IX libre intraeritrocitaria	FPP
Radioinmunoensayo	RIA
Testosterona	T

**1. INTRODUCCION.**



### **1.1. Antecedentes.**

La patología por plomo en el hombre, así como sus efectos sobre distintos tejidos, órganos y sistemas en animales de experimentación, han sido ampliamente estudiados por distintos autores y grupos de investigación sobre distintos modelos experimentales y series epidemiológicas.

La lista de los efectos del plomo sobre sistemas orgánicos es muy amplia en el hombre, y se apoya en estudios epidemiológicos que analizan series muy extensas de población expuesta frente a grupos de población laboral control ( no expuesta ).

El estudio sobre las alteraciones biológicas por plomo ha experimentado a lo largo del tiempo nuevas aportaciones que han modificado antiguas afirmaciones de los efectos atribuidos al plomo inorgánico y han incorporado nuevos efectos. Para confirmar con fiabilidad y suficiente objetividad estas tesis, se han realizado nuevos estudios epidemiológicos ampliando al máximo las series de población expuesta y no expuesta. Dentro de este contexto, por ejemplo, se enmarcarían los trabajos sobre hipertensión de Vigdortchick ( 1935 ), en los que halló una asociación entre absorción de plomo e hipertensión, pero basó este hecho en observaciones de la presión sanguínea de 2769 trabajadores de quienes sólo registró la presión sistólica. Este trabajo no ofrecía datos seriados de casos individuales y omitió un dato importantísimo, la cuantía de la absorción de plomo en cada trabajador.

Belkmap (1936 ) publicó 2600 observaciones seriadas de tensión sanguínea efectuadas sucesivamente durante un año en trabajadores



que habían absorbido grandes cantidades de plomo. Los casos descritos habían estado intensamente expuestos al humo de plomo fundido o al polvo de óxidos de plomo, y todos ellos mostraban ribete de Burton en las encías, o punteado basófilo o una elevada excreción de plomo en orina. El 58 % de estos trabajadores habían estado expuestos durante períodos de tiempo que oscilaban entre los cinco y los nueve años. Los casos se estudiaron por grupos de edades y tiempo de exposición, y concluyó que no habían alteraciones en los valores normales de la tensión arterial. Dreessen (1943 ), demostró que la prevalencia de hipertensión arterial en la población laboral expuesta no era significativamente distinta a la de otros trabajadores industriales.

Al revisar en la literatura los efectos del plomo sobre la salud del hombre, y más concretamente sobre población laboral expuesta, observamos que hay bastantes trabajos sobre los efectos a nivel cromosómico y fertilidad. Pero al valorar los datos bibliográficos, sorprende la escasez de los mismos sobre la función testicular en población laboral expuesta, así como el escaso número de trabajadores en las series estudiadas (  $n=6$ ,  $n=10$  ), aunque sorprende mucho más la falta de relación de los efectos del plomo con el tiempo de exposición de los trabajadores , insistiendo en correlacionar los niveles de plomo en la sangre con el grado de alteración de la función testicular, valorando únicamente la testosterona en suero , y sólo en algunos casos LH y FSH. En ninguno de estos trabajos se utilizan marcadores biológicos más sensibles y específicos de exposición laboral, como la Cinc-Protoporfirina IX, Protoporfirina IX libre o actividad  $\delta$ -aminolevulinico-deshidratasa, que la concentración de plomo en la sangre.

También en el campo de los modelos experimentales en ratas y ratones se observa una gran dispersión en cuanto a la duración de los ensayos, concentraciones de acetato de plomo en el agua de bebida, así como resultados contradictorios.

En población laboral expuesta, los resultados son variables según autores. Para unos, no se observan alteraciones endocrinológicas significativas, Cullen y col.( 1984 ); mientras que para otros, sólo se producen estas alteraciones de la función testicular en los trabajadores intoxicados, que manifiestan síntomas clínicos de saturnismo, ( Braustein y col., 1978 ).

Ante esta diversidad de opiniones en cuanto a los resultados, número no significativo de casos estudiados y la omisión del tiempo de exposición, esta tesis pretende clarificar algunos de los aspectos planteados sobre la alteración de la fertilidad por efecto del plomo, y en concreto se centrará sobre : la alteración de la función testicular, determinando los niveles del índice de testosterona libre en suero de población laboral expuesta, y valorará algunos aspectos complementarios sobre el proceso de síntesis de testosterona a nivel testicular, en un modelo experimental en ratones Balb C machos, correlacionándolos con valores de plomo a nivel tisular a lo largo de un período de exposición de seis meses.

## 1.2. Prólogo histórico.

La toxicidad por plomo, y en concreto el saturnismo como enfermedad laboral, se conoce desde hace muchos siglos, pero en la actualidad el estudio de este metal, no sólo en el campo ocupacional, tiene un especial interés, debido a su amplia utilización como antidetonante de la gasolina ( en forma de plomo tetraetilo ) y su impacto en el medio ambiente en las sociedades industrializadas. En 1986 nuestro país redujo la concentración de plomo en la gasolina de 0.6 a 0.4 g/L, y está en proyecto reducir su concentración hasta su total desaparición en 1992, según las directivas de la Comunidad Económica Europea. El plomo será substituido por el Metil-terbutil-eter como antidetonante de las gasolinas, ( Semillas, 1986 ), lo que posiblemente determinará que el plomo deje de ser un problema del medio ambiente, limitándose de nuevo su patología al medio laboral.

### 1.2.1. Utilización del plomo:

Se tienen datos sobre la utilización del plomo desde la más remota antigüedad. Son datos aislados, pero relativamente numerosos. En el antiguo Egipto se ha encontrado este metal en cerámicas, en una estatua de plomo del alto Egipto ( 3850 años a.C. ), y en tributos del faraón Tutmosis III 1500 a.C. En tiempos más recientes, Jenofonte, en el siglo IV a.C., efectúa una de las primeras referencias sobre este metal que llama cerusa y del que comenta que los egipcios lo empleaban como cosmético. La cerusita,  $PbCO_3$  ( carbonato de plomo ),

constituyó el primer prototipo de plomo blanco, y se utilizaba en forma nativa.

Vitrubio, ( 15 años a.C. ), descubre accidentalmente un óxido de plomo, el sandaraca ( minio ) en un recipiente de cosméticos de plomo blanco expuesto al calor del fuego. A comienzos de la era cristiana, se producía óxido de plomo por calentamiento de la cerusa, y posteriormente se descubrió el método para fabricar el óxido de plomo o litargirio (  $PbO$  ). El plomo tuvo una importante utilidad dentro de la tecnología de los romanos, quienes lo utilizaban en cantidades muy elevadas. Se ha calculado que la producción de plomo durante los cuatro siglos del imperio romano, fué de unos 15 millones de toneladas. Los romanos utilizaron extensamente el plomo para impermeabilizar los acueductos. También lo empleaban en la canalización de las aguas, fabricando tubos de diferentes medidas, de unos 3 m. de longitud y hasta 15 medidas distintas de diámetro. Se cree que a finales de la época de Constantino, había unas 8.000 toneladas de plomo en los acueductos.

Plinio cita que las fuentes de producción de materia prima más importantes eran Hispania y Britania. En la población británica, la impregnación por plomo fué muy importante, según se desprende de estudios realizados por Waldron, ( 1974 ), en restos óseos de diferentes períodos. La fuente principal de impregnación debió producirse a través de los alimentos y las bebidas, porqué las conducciones y depósitos podían estar revestidos de plomo.

### 1.2.2. Patología por plomo.

### 1.2.2.1. El camino de las adulteraciones. La vía alimentaria.

El primer gran camino que introdujo el plomo en la patología, que ya empezaba a ser conocida por sus características y su etiología, fué el de la alimentación. Primero como contaminante no conocido y después como adulterante de los alimentos. Una práctica antigua y extendida durante siglos, fué la de recuperar el vino que se había agriado añadiéndole alguna sal de plomo. Así, con su gusto dulce, se podía disimular el inicio de un proceso de avinagramiento. Cuando el vino empezaba a agriarse, se le añadían sales de plomo para poderlo vender como bueno. El hecho fué prohibido y hay testimonio escrito en un edicto imperial de 1598, ( Waldron, 1974 ) . La práctica persistió durante mucho tiempo a pesar de que las penas impuestas eran muy severas.

Es un hecho conocido que en la ciudad de Ulm ( RFA ), durante los años 1695 y 1696, se practicó este método y que a mitad del siglo XVII, en París, esta práctica estaba tan extendida, que en tres años se rehicieron, y por tanto adulteraron y vendieron como vino en buen estado, 30.000 barriles de vinagre. Mitjavila (1791 ) cita también una referencia de Stahl: **" Un vinatero que añadía óxido de plomo ( litargirio ) al vinagre, fué condenado a muerte, porque había encontrado el secreto de arreglar el vino que se hacía agrio mediante el litargirio."**

También se usaba el plomo para recubrir elementos metálicos de cocción y recipientes de cocina, o bien como elemento de soldadura, para la reparación de recipientes, y sobre todo porque formaba parte de

las impurezas del estaño del que tenían que estar hechas las piezas.

El estaño que procedía de Inglaterra era caro y contenía una cierta proporción de plomo. Aquí se le añadía bastante más.

Así se hicieron famosos diferentes episodios de intoxicaciones alimentarias, que persistían crónicamente, y que en cada país tenían su descripción específica. De esta manera se hablaba de cólicos de Devonshire en Inglaterra, del cólico de Poitou en Francia, del cólico de Madrid en España. En todos ellos se aclaró la etiología por diferentes trabajos del siglo XVIII. Hay que añadir que este tipo de dolor ya estaba relacionado con la actividad de algunos pintores y se le daba el nombre de " colica pictorum ". A pesar de que el cuadro clínico era muy bien conocido, la etiología quedaba hasta entonces oscura,( Corbella ,1981 ).

#### 1.2.2.2. El camino de la exposición laboral.

Los numerosos síntomas del plumbismo fueron apreciados mucho antes de que se atribuyeran a la acción del plomo. Sin embargo, gradualmente, los médicos llegaron a apreciar la causa de estas alteraciones, siendo designado el síndrome como saturnismo, pues el plomo recibía el nombre de saturno por los alquimistas, debido a que, según afirmaban, absorbe y devora todos los metales imperfectos. Algunos de los efectos tóxicos del plomo eran familiares a los médicos griegos, romanos y árabes y anteriores a la era cristiana. Hipócrates ( 370 aC ) describió un grave ataque de cólico sufrido por un hombre que se dedicaba a la extracción de metales, y fué probablemente el primero de los antiguos en advertir que el plomo era la causa de los síntomas.

La relación que existe entre estreñimiento, cólico, palidez, parálisis y disturbios oculares, con la acción del plomo sobre el organismo fué observado por Nicander en el siglo II a C. Plinio ( 23-79 ) afirma que los antiguos pintaban los bancos con cerusita nativa, en su época la intoxicación por plomo ya era conocida, y los trabajadores de productos de plomo se cubrían el rostro con sacos holgados, a fin de evitar la inhalación de polvo nocivo.

Dioscórides, ( año 100 ), descubrió que la ingestión de compuestos de plomo originaba cólicos, parálisis y delirio. El plomo blanco se utilizaba en Inglaterra en el siglo XIII, y ya entonces se sabía que intoxicaba a los trabajadores que lo manejaban. En 1713 Ramazzini apreció que en los alfareros que trabajaban con plomo se advertían a menudo sus efectos nocivos, en forma de " temblor de manos, que inicialmente se manifestaba en las manos y luego era seguido de parálisis ", ( Hunter , 1985 ).

#### 1.2.2.3. La obra del Dr. Vicente Mitjavila.

Una de las contribuciones más importantes sobre los efectos del plomo, a nivel laboral y alimentario, lo constituye la obra del Dr. D. Vicente Mitjavila, que en 1791, en su libro " De los daños que causan al cuerpo humano LAS PREPARACIONES DEL PLOMO, YA ADMINISTRADAS COMO MEDICINA, YA MEZCLADAS FRAUDULENTAMENTE CON LOS ALIMENTOS DE PRIMERA NECESIDAD, comenta, referente a la cólica saturnina, lo siguiente: " **La mas terrible de las cólicas, que unos llaman saturnina, otros de Poitou & c es la enfermedad que**



con mas frecuencia causa el plomo introducido en el cuerpo humano. Sauvages la coloca en la clase 7<sup>a</sup>, de su Nosologia, órden 5, genero 29 y dice: "*que consiste en unos atrocisimos dolores, que se extienden hasta a los lomos, y dorso, sin que se aumenten, aunque se comprima el estomago : algunas veces se retrahe el ombligo, manteniendose el vientre obstinadamente cerrado, y todo eso termina en una torpeza de manos, y paralisis, otras veces en unas contracciones crónicas de las extremidades*". Están expuestos á esta cólica los Pintores, Alfaréros, y en una palabra, los trabajadores del plomo, y todos los que están expuestos á sus vapores.

El Hospital de la Caridad de Paris, fundado en el año 1602. por la Reyna Maria de Medicis, comunmente se mira como destinado al alivio de los trabajadores atacados de la colica metálica. Desde Enero de 1755, hasta fines de Junio de 1767, se medicaron en él 1353 enfermos, y notó M.Gardane que en este número apenas se hallaban 12 que no fuesen Pintores, gentes que trabajan el plomo, ú otros, cuyo oficio les expone á la acción de este metal. Desde la mas remota antigüedad se ha culpado siempre al plomo en la producción de esta dolencia, atribuyendole una calidad fria, y secativa, y he observado, que quantos han hablado de los efectos del plomo, han dado una exacta descripción de esta enfermedad. Las preparaciones de plomo, dice Macquer, no son muy usadas en la Medicina, sino que sea en lo externo, por causa de las colicas, y perlesias que ocasionan.



En otro capítulo refiriéndose a los: " Daños que pueden causar algunas pinturas, en especial los juguetes pintados que se dan a los niños ", comenta : Bernardino Ramazzini, en su precioso tratado de las enfermedades de los artífices, dice que la principal causa de las que padecen los Pintores, por razón de su oficio, es la materia de los colores, que siempre tienen en las manos, y cuyos depravados vapores reciben por las narices, y mas abaxo dice con autoridad de Fernelio que : " Cierta Pintor padeció un dolor fuerte en las manos, y dedos, y luego una convulsión, que le cogió el brazo: sucesivamente experimento lo mismo en los pies, y por último un dolor tan vehemente en el vientre, y ámbos hipocondricos, que en el exceso no tenia consuelo, sino quando tres, ó quatro hombres se le cargában con todo su peso encima del vientre; pero finalmente murió al cabo de tres años de tanto padecer."

En el tomo segundo de la Biblioteca económica se halla una memoria de M.Gardane sobre una especie de colica metálica observada en los navegantes, y causada por el olor que echan los navios recién pintados. Si el vapor de las pinturas trastorna de tal suerte la economía animal ¿ que hará la materia venenosa de los colores, quando llega al estomago de los tiernos infantes mezclada con la saliva?. Aprendan de aqui, y conozcan á quan inminente riesgo exponen la salud de sus hijos, los Padres incautos, las amas inadvertidas, y en una palabra todos aquellos, á cuyo cargo está el cuidado de la infancia, quando para entretener á los

niños, les dan aquellas figuras de madera, cartón, ú otra materia pintada, que para este fin se venden en las ferias de Barcelona. Hay algunos que por economia prefieren los entretenimientos de madera, y escogen la amarilla, creyendo que es de box. Estos no van ménos errados, porque el color de box se lo dan á qualquiera madera, fregandola fuertemente con el oropimente, veneno tan peligroso, como saben todos. Los que hacen esto, es verosimil, que no sepan que pueden perjudicar la salud pública, de otra suerte no lo harian tan públicamente como puede notar cualquiera. Poco tiempo hace que el Coronel Don Alexandro de Butron, Capitán de Reales Guardias Walonas me refirió, que en Tarragona havia una hija de cierto Cavallero Militar, que vivia muy flaca, y extenuada, y que haviendose advertido á su Madre, que los entretenimientos con que jugaba la niña eran la causa de todo, por estar pintados con el oropimente, y que era menester hacerlos hervir con agua, se practicó asi, y la niña de contado se fué poniendo buena, robusta, y de buen color.

Me parece propio de este lugar advertir á las mugeres, que usan pezonéras de plomo para hacerse los pezones, que, ó, prefieran las de madera, o se laben bien los pezones antes de dar el pecho á los niños, porque de otra suerte expondrían sus hijos á graves inconvenientes . Observarán, si bien lo advierten, que quedan negros los pezones, quando se quitan las pezonéras, cuyo color proviene del plomo, que ha quedado adherente á la piel. Asi mismo conviene que se laben bien los

pechos ántes de darlos al niño aquellas mugeres que por tener mal en ellos, les es preciso ponerse unturas, unguentos cerotos, &amp. porque en casi todos estos entra alguna preparación de plomo, que puede tragar el niño mamándo.

En el dia primero de Agosto de este año fuí llamado á visitar un niño de dos meses y medio en la calle del Pou de la Cadéna, Num.7.quarto 2º., y lo hallé con convulsiones en los ojos, y retortijones de tripas. Exâminadas las causas que pueden ocasionar estos accidentes, no sabia atinar con la productriz de aquella dolencia, quando supe que su Madre tenia mal en los pechos, y que se ponía un unguento, que dixo haverla trahido una muger de aquellas, que dicen que curan de gracia, y añadió, que recelába que su hijo se havia tragado algun poco mamándo. El unguento se componia de una materia oleosa, y unos polvos blancos mal mezclados. Mandé preguntar la composición para mi régimen, y digéron que respondió la curandera: "*Digan al Medico, que yo sé muy bien que el unguento no puede dañar a la madre, ni al hijo, y que no quiero revelarle el secreto.*". Examiné el referido unguento con la tinta simpática de la que hablaré mas abaxo, y al instante se manifestó el plomo que contenía en abundancia, parte del cual havia tomado el niño con tanto ménos cuidado de parte de su Madre, quanto esta creía que no podia dañarle. Tratéle con método laxante, y lenitivo de Hüen, respecto de ser una criatura tierna, y delicada, mas viendo, que el mal tomaba incremento no dudé ponerle el método, que se practica en el

Hospital de la Caridad de Paris, para la curación de las enfermedades, que trahen origen del plomo, aunque procuré moderar los remedios, según la edad, y fuerzas del niño. Pero he de confesar con sentimiento que el mal superó los auxilios del arte; pues murió el niño en el día 14 del mes, y de la enfermedad, haviendosele puesto la lengua gorda de un dedo, y pegado el pico al paladar, sin contar con las convulsiones contínuas, que padeció desde el principio, hasta al último."

Referente a las perlesias, concluye: " No aseguraré que las perlesias, ó feriduras, que tan á menudo se observan en esta Ciudad, provengan del plomo, pero si diré que este metal introducido en el cuerpo humano, debe considerarse como una de las causas predisponentes mas poderosas de esta enfermedad, y por tanto dar á conocer esto al Público, advirtiendole los medios con que puede introducirse plomo en el cuerpo humano, prepondéra á los pánicos, é infundados recelos de instruir a aquellos, que procuran enriquecerse, aunque sea a costa de la vida, y salud de los hombres."

#### 1.2.2.4. Alteraciones de la función testicular.

Los primeros datos históricos que hemos encontrado sobre los efectos del plomo sobre el eje Hipotálamo-hipófiso-testicular, y en concreto sobre la libido masculina, son los recogidos y descritos por el Dr Vicente Mitjavila en 1791, en la obra anteriormente referida, que al respecto comenta: " He leído, si mal no me acuerdo, en Sauvages, que cierto confesor

hacía tomar el azúcar de plomo á los penitentes, que se acusaban de esár agitados de pasiones impuras, hasta que escarmentó en uno, que se fué extenuando, y al final murió paraliticado."

Lo cierto es que M.Malouin en su tratado de Química dice así : " *A pesar de los malos efectos, que ha hecho conocer la experiencia, que tiene el plomo tomado interiormente, muchos Medicos aconsejan la sal de saturno, desde las dosis de medio grano hasta quatro, y sobre todo se recomienda para extinguir los fuegos de la concupiscencia...*"



### 1.3. Ciclo biológico del plomo.

El plomo es considerado como un tóxico eminentemente social, su intoxicación siempre ha ido paralela al desarrollo y evolución de la sociedad. A medida que las sociedades avanzan y progresan, el plomo las acompaña en dicha evolución, como si fuera parte del precio que la humanidad debe pagar para conseguir determinados niveles de prosperidad.

En el prólogo histórico hemos citado ya la extensa utilización que del plomo hacían los romanos, pero el posterior consumo de plomo en nuestro mundo se puede examinar desde un punto de vista más objetivo , figura 1 , puesto que en la actualidad tenemos a nuestra disposición datos directamente relacionados con su utilización y posterior contaminación ambiental . Algunos estudios sobre la concentración de plomo en la nieve de algunos estratos de edades conocidas en Groenlandia, nos muestran que la contaminación ambiental por plomo se ha ido incrementando a lo largo del tiempo, figura 2 , en esta gráfica se observan dos cambios de pendiente, una de ellas alrededor de 1750, coincidente con el inicio de la revolución industrial, y otra alrededor de 1925, que se debe a la incorporación de derivados orgánicos de plomo como antidetonantes en las gasolinas. Actualmente más de un 95 % del plomo atmosférico procede de esta utilización.

Valoraciones estimadas sitúan la concentración de plomo actual en la corteza terrestre, alrededor de 16 ppm, y si no se corrige adecuadamente este fenómeno, el incremento anual se situará alrededor de 0.1 ppm/año, figura 3. Una de las aportaciones más

**PRODUCCION MUNDIAL EN 1974 2,5 M de TM**

**CONSUMO DE 3,5 M de TM**

**EN 1960 EMISION A LA ATMOSFERA DE 700.000 TM**

**400 TM EN EL AREA METROPOLITANA DE BARCELONA**

**EN LA CORTEZA LA CONCENTRACION ES DE 16 ppm**

**INCREMENTO ANUAL DE 0,1 ppm/año**

**COMUNIDAD ECONOMICA EUROPEA**

**PRODUCCION EN 1984 1480 KT**

**CONSUMO EN 1984 1530 KT**

**Figura nº 1**

CONCENTRACIONES DE PLOMO EN ESTRATOS  
DE NIEVE DE GROENLANDIA

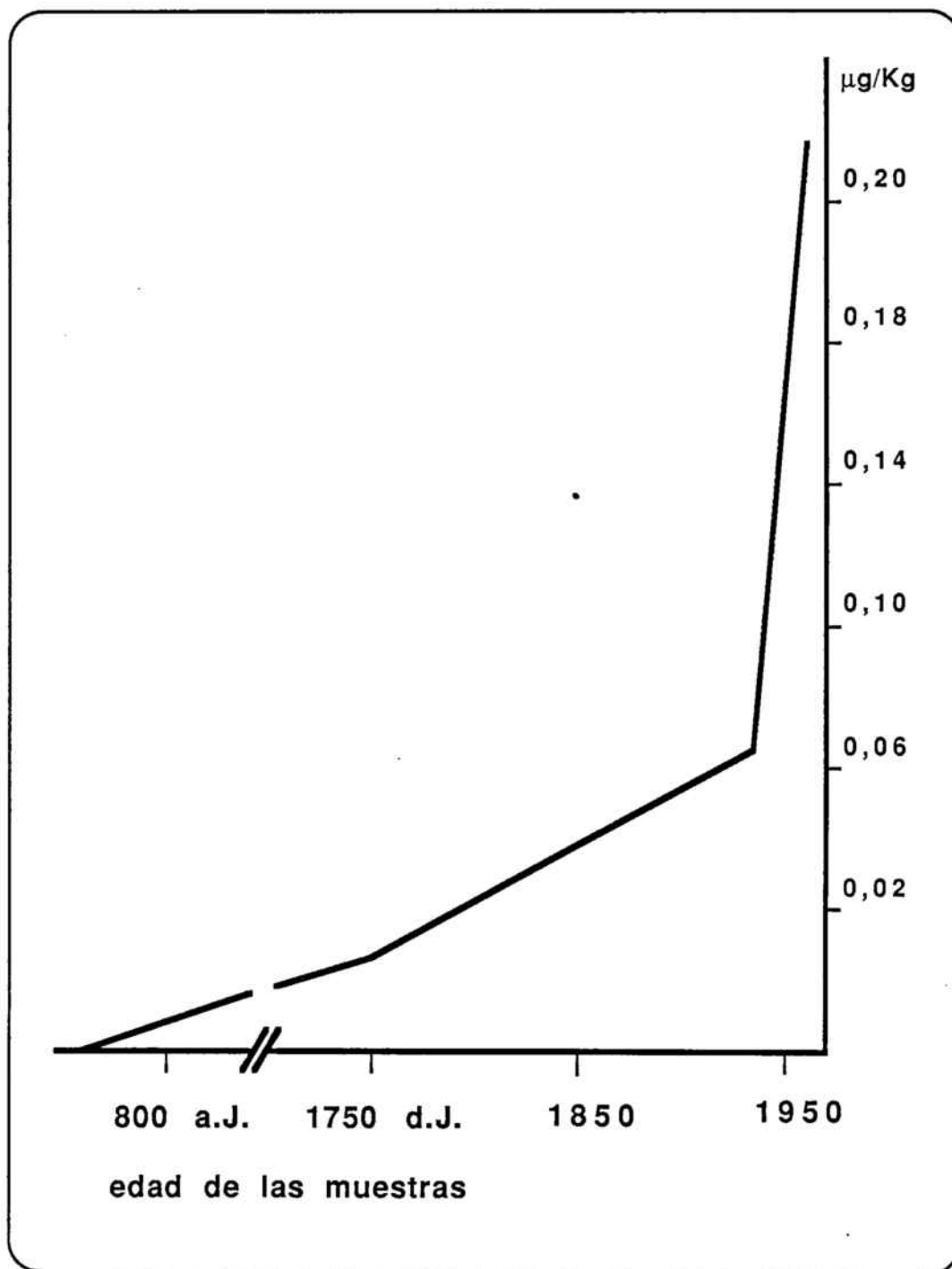


Figura nº 2



CICLO AMBIENTAL DEL PLOMO

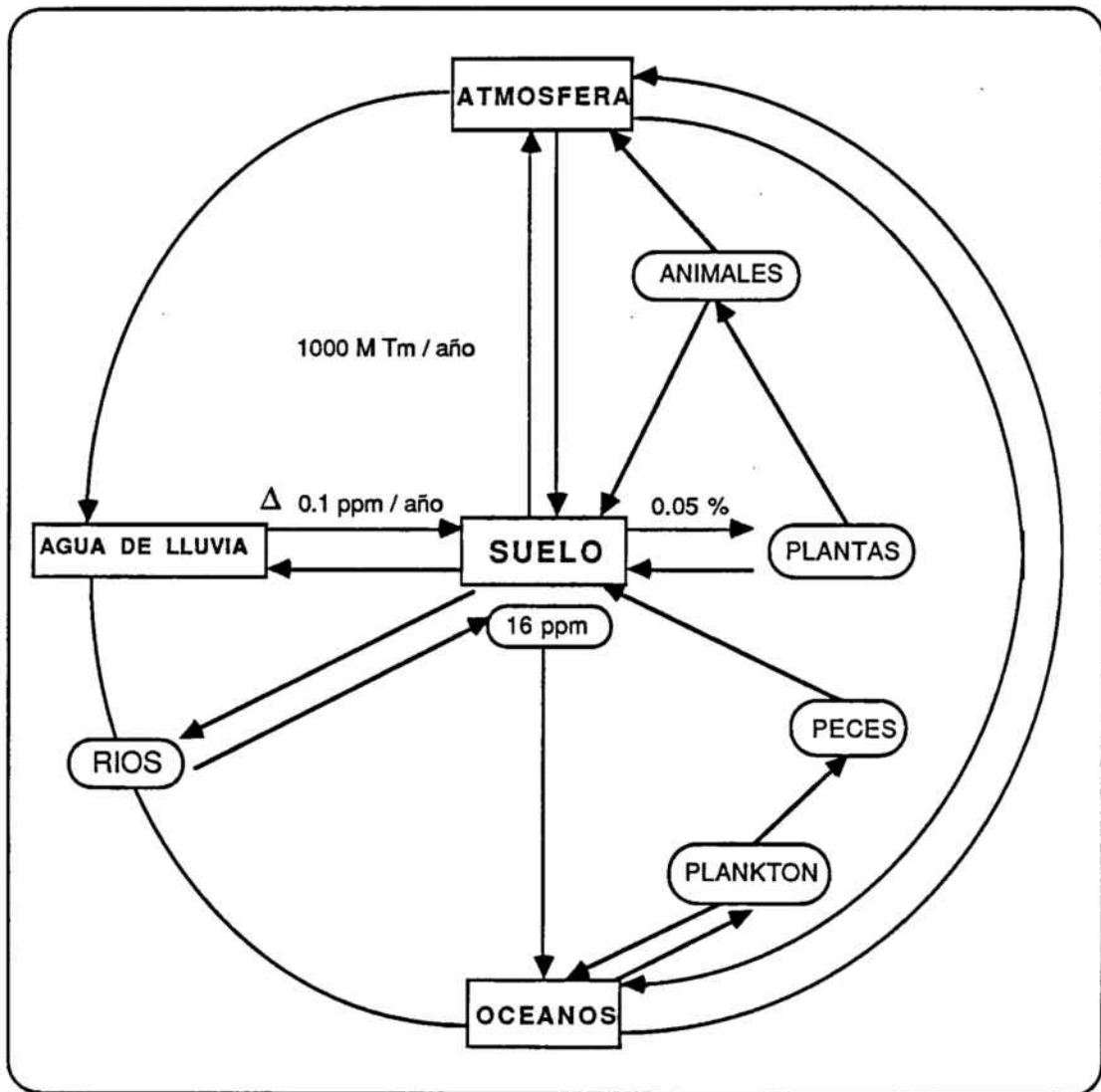


Figura nº 3

importantes en el campo medioambiental es la realizada por Quinche y col. ( 1969 ), que cifra la contaminación por plomo en una autopista por la que circulan 1000 vehículos / hora , en unos 260 Kg/Km/año.

Estudios realizados con  $^{210}\text{Pb}$ , nos demuestran que la permanencia de las partículas expulsadas es de 7 a 30 días y que su deposición se efectúa principalmente por acción de la lluvia y por fenómenos de agregación de partículas ( mayores de  $0.5 \mu$  ).

La contaminación ambiental se manifiesta también en el incremento de los niveles de plomo en las aguas marinas a distintas profundidades. Al estudiar los sedimentos marinos se observa que en los estratos de hace unos millones de años, la cantidad de plomo que se acumulaba anualmente era de 13 millones de toneladas; mientras que en la actualidad, el aporte fluvial anual es de aproximadamente unos 240 millones de toneladas de plomo. Al estudiar la concentración de plomo en las aguas oceánicas, observamos que las aguas superficiales del Océano Pacífico y Mar Mediterraneo, registraban unos valores muy aumentados respecto de la concentración de las capas más profundas, que se suponen de mayor antigüedad, ( Hornos, 1980 ) .

Teniendo en cuenta la concentración de plomo en la gasolina de estos últimos años, y el parque automovilístico de Barcelona, podemos suponer que aproximadamente deben arrojarse anualmente a su ambiente unas 400 Toneladas.

Una evidencia clara del impacto medioambiental que pueden tener determinadas legislaciones sobre la utilización del plomo, es la que observamos en dos estudios seriados de la población de Barcelona

no expuesta laboralmente ( donantes voluntarios de sangre ), en el primero de ellos, realizado en 1983, se observan unos valores medios en sangre de  $18.6 \pm 6.6 \mu\text{g/dL}$ , mientras que los valores observados en 1986 eran de  $14.2 \pm 5.3 \mu\text{g/dL}$ , tabla I y figuras 4 y 5, que se correlacionan con la disminución del contenido de plomo tetraetilo en la gasolina, 0.6 gr/L en 1983 y 0.4 gr/L en 1985 ( B.O.E. nº 60 de 11 de Marzo de 1985 ), ( Torra y col. comunicacion personal )

### 1.3.1. Exposición ambiental.

El plomo ha atraído la atención de muchos autores, puesto que es sospechoso de ser un contaminante con importantes efectos sobre la salud de los seres humanos.

El plomo se encuentra en pequeñas concentraciones en todas las muestras de suelos estudiados, ( Waldron y Stöfen, 1974 ), al igual que en la atmósfera. La comida diaria, así como el agua ingerida por una persona adulta, contiene alrededor de 200 a 500 $\mu\text{g}$  de plomo. En cambio, fuera de las zonas donde se desarrollan actividades humanas, la concentración de plomo en la atmósfera es tan baja que la captación de este metal por via respiratoria es insignificante. En nuestra sociedad industrial, no obstante, las concentraciones de plomo en el aire son elevadas; valores de 0.5 a 2.0  $\mu\text{g/m}^3$  no son inusuales, figura 6. La mayor fuente de emisión son los gases procedentes de los tubos de escape de los coches. Desde los años veinte, los compuestos orgánicos, como el plomo tetraetilo, se han añadido a la gasolina en cantidades que han variado considerablemente a lo largo del espacio y del tiempo.

**RESULTADOS DE PLOMO EN SANGRE  
EN LA POBLACION DE BARCELONA**

	<b>N</b>	$\bar{X} \pm ds$	<b>PERCENTIL 98</b>	<b>RANGO</b>
<b>MUESTREO 1983</b>	<b>115</b>	<b>18.6 ± 6.6</b>	<b>32</b>	<b>7 - 39</b>
<b>MUESTREO 1986</b>	<b>100</b>	<b>14.2 ± 5.3</b>	<b>25</b>	<b>7 - 32</b>

$\bar{X} \pm ds$  :  $\mu\text{g} / \text{dL}$

**Tabla nº I**

DISTRIBUCION DE PLOMO EN SANGRE EN LA  
POBLACION DE BARCELONA

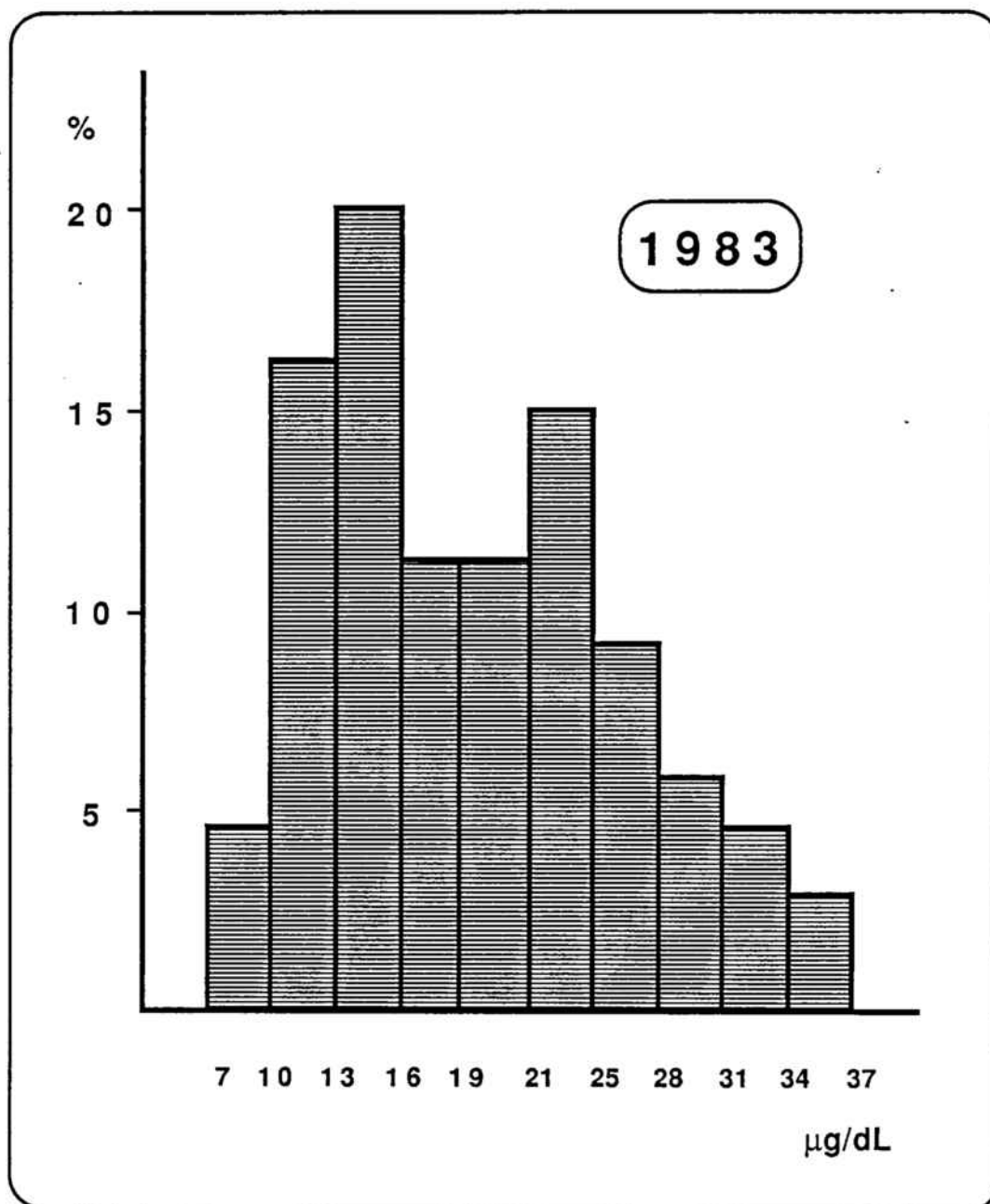


Figura nº 4

DISTRIBUCION DE PLOMO EN SANGRE EN LA  
POBLACION DE BARCELONA

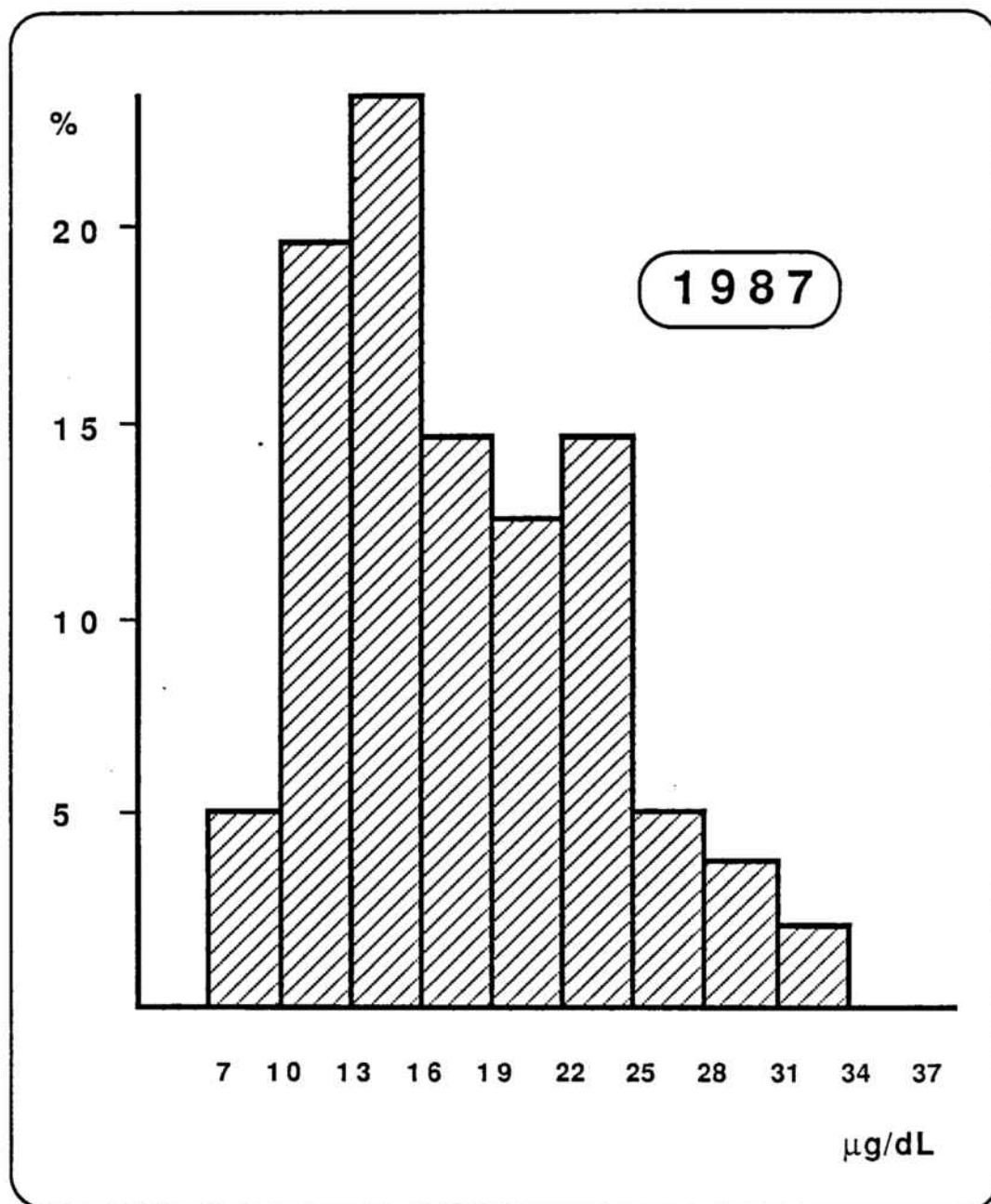


Figura nº 5

**CONCENTRACIONES DE PLOMO EN LA ATMOSFERA**

	<u><math>\mu\text{g} / \text{m}^3</math></u>
Pacífico Central.....	0.001
Groenlandia.....	0.005
Edimburgo-Glasgow.....	0.250
Berlín-Londres.....	3.000
Los Angeles.....	6.600
Milán.....	7.300
París.....	9.800

**Figura nº 6**

Los compuestos orgánicos del plomo se transforman rápidamente en el ambiente en compuestos inorgánicos estables como són:  $\text{PbO}_2$ ,  $\text{Pb}_2\text{O}_3$ ,  $\text{PbCl}_2\text{O}$ .

Blumer y Reich ( 1975 ), describieron que pacientes que vivían 24 horas al día cerca de una autopista con mucho tráfico, podían mejorar de síntomas como dolor de cabeza, fatiga, indigestión y alteraciones nerviosas con un tratamiento anti-plomo ( mediante inyecciones de EDTA que movilizan los depósitos de plomo del organismo, reduciendo su concentración ). Blumer y Reich. ( 1976 ), demostraron que individuos altamente expuestos a los humos de los coches tenían una incidencia relativamente elevada de cáncer. Sin embargo, si semejantes personas eran tratadas contra el plomo con inyecciones de  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$ , la incidencia de cáncer era mucho menor. Estos hallazgos sugieren que el plomo, tal vez, asociado con otros productos, sea carcinogénico,( Hoffman y Niyogi, 1977 ).

El plomo penetra en el organismo a través de los alimentos, bebidas y vía respiratoria. En la sangre, del 90 al 96 % del plomo está unido a los hematíes y del 4 al 10 % puede hallarse en el plasma,( Waldron y Stöfen, 1974 ). Desde la sangre, el plomo es rápidamente distribuido a los tejidos. El plomo es absorbido inicialmente por el hígado y los riñones, pero después, con cierto retraso, pasa a todos los compartimentos del organismo. El proceso de captación de plomo por los huesos se realiza lentamente, pero en la fase de equilibrio el esqueleto llega a acumular el 90 % o más del contenido total de Pb en el organismo , ( Castellino y Aloj,1964 ), ( Di Ferrante y Bourdeau,1973 ).



## 1.4. Cinética del plomo en el cuerpo humano.

### 1.4.1. Antecedentes históricos:

En 1861 Gusserow y en 1871 Heubel descubren la presencia de plomo en los huesos, y el papel que juega este tejido en la acumulación de plomo inorgánico. La teoría del flujo del plomo en el organismo la expone por primera vez Straub en 1911, y posteriormente Erlenmeyer en 1913. De 1926 a 1929, Aub, Minot & Fairhall describen las analogías que existen entre el metabolismo del calcio y el del plomo, y la similitud de comportamiento del fosfato cálcico  $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$  y el fosfato plúmbico  $\text{Pb}_3 (\text{PO}_4)_2$ .

### 1.4.2. Exposición laboral.

Legge y Goadby ( 1912 ), establecieron que, en la absorción industrial, la que tiene lugar a través del tracto respiratorio es cien veces más importante que la efectuada a través del tracto gastrointestinal. Hasta el trabajo de Aub, Fairhall, Minot y Reznikoff ( 1925 ), faltaban observaciones de naturaleza cuantitativa sobre la absorción de plomo, así como sobre su almacenamiento, eliminación, y mecanismo de acción en sangre, músculos y nervios.

#### 1.4.2.1. Almacenamiento del plomo en los huesos.

Los trabajos de Guserow ( 1861 ) y de Heubel ( 1871 ) , indicaron que el lugar de almacenamiento del plomo era el esqueleto. Minot y Aub ( 1924 ) demostraron cuantitativamente que en el hombre y los animales, casi todo el plomo se almacenaba en los huesos, y los resultados de sus experimentos evidenciaron que el plomo está presente en forma de fosfato terciario insoluble. Diversos experimentos mostraron que se deposita en la porción calcárea de los huesos y no en la médula ósea. Minot obtuvo datos que probaban este aserto, produciendo intoxicación por plomo en pollos, y examinando luego los huesos huecos de las alas, que constan de una diáfisis carente de médula ósea. Esta autora demostró que los huesos contenían una cantidad de plomo relativamente igual a la existente en los demás huesos del pollo. Por lo tanto, el plomo debe almacenarse en los huesos y no en la médula ósea.

Durante las distintas fases de la intoxicación, la distribución del plomo varía en el organismo. Cuando la absorción es lenta, especialmente en el estadio crónico del plumbismo, aproximadamente el 95 % se mantiene de forma inócua en el esqueleto. Por otra parte, si el plomo se absorbe en gran cantidad, se distribuye más uniformemente a lo largo de los tejidos. En necropsias de trabajadores del plomo, el análisis de los huesos ha demostrado que la cantidad total de plomo almacenado en el esqueleto oscila entre 0.2 y 0.8 g. Ya que el calcio y el plomo són almacenados en el esqueleto en forma de fosfato, resulta de gran interés el descubrimiento de que la excreción de estas sustancias tiene lugar en forma paralela . Repetidas observaciones han demostrado que las condiciones que favorecen el almacenamiento del calcio en el

organismo, favorecen el almacenamiento del plomo. Cuando las condiciones son desfavorables para la retención del calcio, se incrementa la excreción del plomo almacenado.

#### 1.4.2.2. Excreción de plomo.

Para realizar estudios correctos de excreción, es indispensable recoger muestras de orina y heces, durante tres días seguidos. Las personas sanas sin exposición ocupacional al plomo, pueden excretar plomo en las heces y en la orina. Esto obedece al hecho de que el plomo suele hallarse en el suelo, y por tanto, en la vegetación y los alimentos naturales. Cholak y Bombach ( 1943 ), estudiaron a 1052 personas sanas, sin exposición ocupacional al plomo, y hallaron que las cantidades medias de plomo eran : 0.030 mg/dL en sangre, 0.027 mg/dL en orina y 0.28 mg en muestras de orina de 24 horas. La exposición laboral a este metal eleva estos valores, y las cifras correspondientes en un trabajo donde se valoran a 86 operarios que trabajaban en la producción de plomo blanco fueron de 0.086, 0.241 y 3.76 mg.

#### 1.4.2.3. Plomo en sangre.

La falta de una relación directa entre plomo sanguíneo y los síntomas de intoxicación por plomo, se ha observado con relativa frecuencia, ( Cantarow y Trumper, 1944 ). Aunque está ya demostrado que las cifras de plomo sanguíneo en grupos de trabajadores del plomo son superiores a las de la población de referencia no expuesta, los cambios de absorción de plomo no se reflejan tan rápidamente en estas

cifras como en las de excreción urinaria. A veces, en casos de plumbismo crónico, el plomo sanguíneo muestra repetidamente cifras normales para trabajadores expuestos ( de 30 a 80  $\mu\text{g/dL}$  ), mientras que, en ocasiones, en un trabajador de plomo con buen estado de salud, se hallan valores de 160  $\mu\text{g/dL}$  . Por lo tanto, no se debe conceder demasiada importancia a las cifras de plomo sanguíneo. Los intentos para establecer los valores críticos en los que tenga lugar la intoxicación, y por debajo de los cuales pueda pensarse que existe cierta seguridad, necesariamente han de ser erróneos, ( Lane, 1949 ). Ahora bien, si las cifras de plomo sanguíneo son más elevadas de lo normal, indican una absorción excesiva, y por tanto, señalan una necesidad de una revaloración de la eficacia de las medidas preventivas respecto del plomo.

#### 1.4.2.4. Modelos compartimentales.

Durante los últimos veinte años han sido publicados muchos datos de polución por plomo y contenidos de plomo en animales de experimentación y en el hombre, pero se han realizado pocos ensayos para integrar los resultados obtenidos a sistemas dinámicos. Castellino y Aloj ( 1964 ), recogieron datos de distribución y excreción de plomo en ratas y ajustaron sumas de dos o tres funciones exponenciales. Su procedimiento sugirió un modelo tricompartmental. Rustagi ( 1965 ), presentó un modelo determinístico con sólo una ecuación diferencial y un modelo estocástico basado en la teoría de queues . Knelson y col ( 1973 ), correlacionaron el incremento previsto en concentración de plomo en sangre al incremento potencial en todo

el organismo.

Rabinowitz y col ( 1973 ) propusieron un sistema tricompartmental, pero confinado a éstos, con sólo tres ecuaciones diferenciales. En este modelo tricompartmental, el compartimento 1 ( sangre ) intercambia continuamente por difusión con el compartimento 2 ( tejidos blandos ) y con el compartimento 3 ( matriz calcárea del esqueleto ),. Las membranas celulares no actúan como barreras para este metal. Cuando se omite la exposición a altas concentraciones, como ocurre en los trabajadores de procesos industriales del plomo, podemos asumir que este proceso de difusión permanece lineal. Batschelet y col. ( 1979 ), propusieron un modelo tricompartmental, figura 7, que traducían a un sistema de tres ecuaciones.

Siendo  $x_1$ = sangre,  $x_2$ = tejidos blandos,  $x_3$ = huesos.

alfa =  $\dot{a}$  = aporte diario de plomo a través de los pulmones, en  $\mu\text{g}/\text{día}$

Beta =  $\beta$  = aporte diario de plomo en el agua y la comida absorbida por el tracto digestivo, en  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

$$Y_{41} = \dot{a} - Z_4 = p \dot{a}, \quad Y_{51} = q ( \beta + Y_{25} )$$

Si permitimos que la variable tiempo ( t ) se mida en días, y que  $x_1(t)$ ,  $x_2(t)$ ,  $x_3(t)$  sean las cantidades de plomo almacenadas en los compartimentos 1, 2, 3, respectivamente, a establecer el balance, se obtienen las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$X_1 = -Y_{12} + Y_{21} - Y_{13} + Y_{31} + Y_{41} + Y_{51} - Z_1$$

$$X_2 = Y_{12} - Y_{21} - Y_{25} - Z_2$$

$$X_3 = Y_{13} - Y_{31}$$

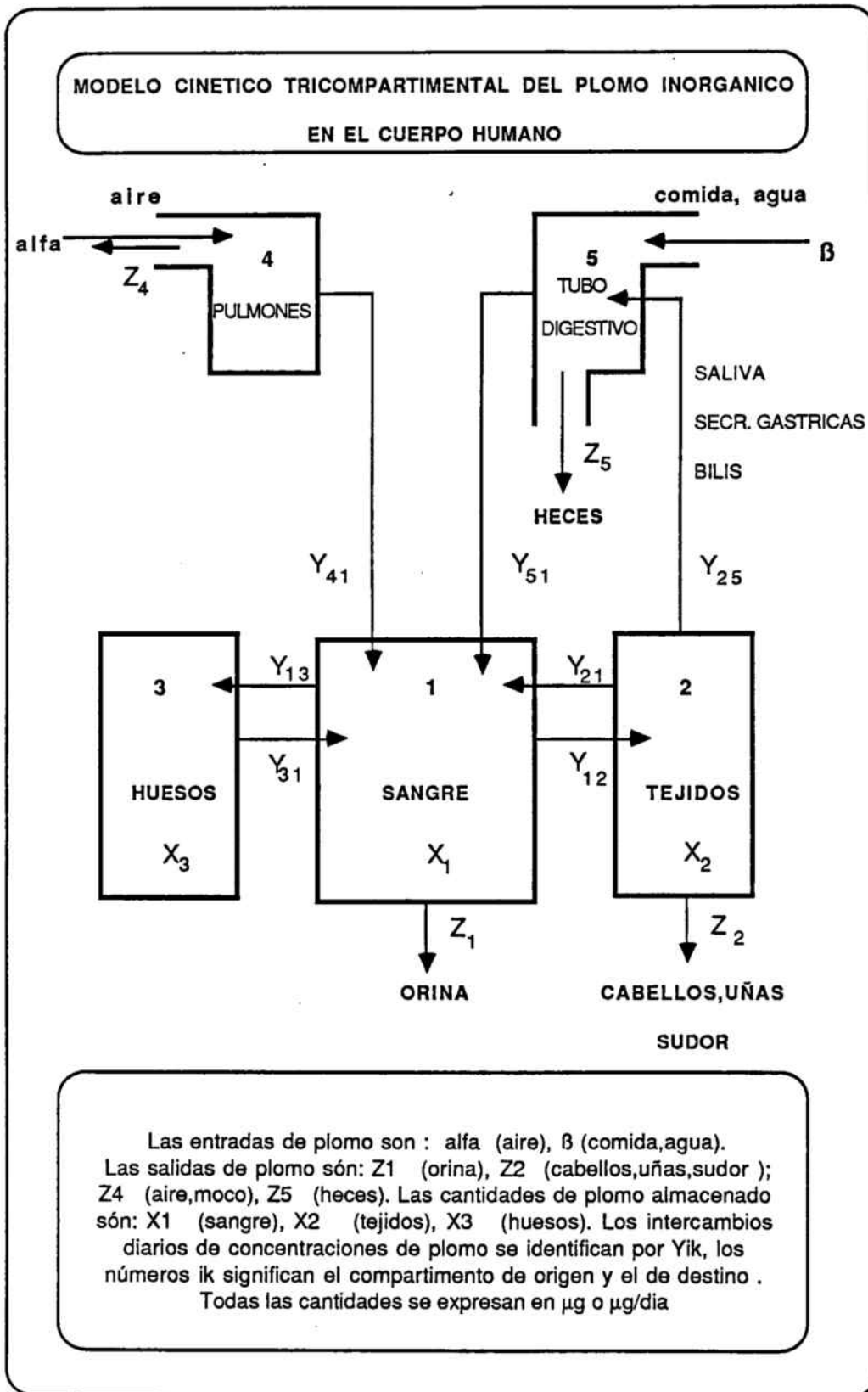


Figura nº 7

combinando los términos, la ecuación puede reescribirse:

$$X_1 = A_{11} x_1 + A_{12} x_2 + A_{13} x_3 + D$$

$$X_2 = A_{21} x_1 + A_{22} x_2$$

$$X_3 = A_{31} x_1 + A_{33} x_3$$

En estas tres ecuaciones lineales diferenciales no homogéneas, la falta de homogeneidad se corrige mediante el término  $D = p \alpha + q \beta$

Para determinar los coeficientes  $A_{ik}$  ( $A_{11}$ ,  $A_{12}$ ,  $A_{13}$ , etc) de esta ecuación, estos autores consideran que el estado de equilibrio se define por:  $X_1 = X_2 = X_3 = 0$ , para todos los valores de  $t$  ( tiempo ). Los tres valores  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$  pueden ser calculados a partir de los datos obtenidos por Rabinowitz y col. ( 1973 ). Este autor ensaya su modelo en un hombre sano de 53 años, que pesaba 70 Kg y fumaba 8 cigarrillos por día. La dieta normal que ingería, contenía 367  $\mu\text{g}/\text{día}$  de Pb. Durante 104 días, parte de la dieta fué substituida por el isótopo estable  $^{204}\text{Pb}$  y diez días de  $^{207}\text{Pb}$ . Al mismo tiempo, y durante 46 días se le suministró una dieta pobre en Pb. Después de este periodo se consideró que el organismo de este voluntario estaba en equilibrio con respecto al Pb. Las mediciones del contenido en Pb fueron realizadas por espectrometría de masas para diferenciar la presencia de los distintos isótopos, con un error estándar inferior al 1 %. En sus cálculos obtuvo los siguientes resultados:

$$X_1 = \text{sangre} = 1.8 \times 10^3 \mu\text{g}$$

$$X_2 = \text{tejidos} = 0.7 \times 10^3 \mu\text{g}$$

$$X_3 = \text{huesos} = 200 \times 10^3 \mu\text{g}$$

$$\text{Alfa } (\alpha) - \text{ via respiratoria} = 49 \mu\text{g/dia}$$

$$\text{Beta } (\beta) - \text{ via digestiva} = 367 \mu\text{g/dia}$$

$$Y_{12} (\text{ sangre-tejidos }) = 20 \mu\text{g/dia}$$

$$Y_{21} (\text{ tejidos-sangre }) = 8 \mu\text{g/dia}$$

$$Y_{13} = Y_{31} (\text{ hueso-sangre-hueso }) = 7 \mu\text{g/dia}$$

$$Y_{41} (\text{ pulmón-sangre }) = 17 \mu\text{g/dia}$$

$$Y_{51} (\text{ tubo digestivo-sangre }) = 33 \mu\text{g/dia}$$

$$Y_{25} (\text{ saliva, secreciones gástricas, bilis }) = 8 \mu\text{g/dia}$$

$$Z_1 = \text{ orina} = 38 \mu\text{g/dia}$$

$$Z_2 = \text{ cabello, uñas} = 4 \mu\text{g/dia}$$

$$Z_4 = \text{ pulmones} = 32 \mu\text{g/dia}$$

$$Z_5 = \text{ heces} = 342 \mu\text{g/dia}$$

Con estos valores, Batschelet y col., ( 1979 ), logran calcular las constantes de su sistema de ecuaciones.

$$p = 17/49, q = 11/125, D = 17 \alpha / 49 + 11 \beta / 125$$

Otros autores aseguran que la ingesta de plomo a través del agua de bebida y los alimentos es mucho mayor que la aportada por la atmósfera y que difícilmente puede ser un riesgo para la salud. Ninguno de los datos de Rabinowitz y col, ni los modelos de otros autores, soportan adecuadamente la opinión anteriormente citada. La principal razón es la diferencia en los incrementos de absorción, mientras que el tubo digestivo absorbe alrededor de un 10 % del plomo contenido en el agua de bebida y comida, los pulmones absorben por encima del 35 % de



la cantidad aportada por esta vía, ( Di Ferrante y Bourdeau, 1973 , Goldsmith y Hexter, 1976 , Karhausen, 1973 , Natusch y Wallace, 1974 , Patterson, 1965 , Schroeder y Tipton, 1968 y Teisinger y col.,1973 ).

### 1.5. Biosíntesis del Hemo.

La hemoglobina es una proteína conjugada, compuesta por una porción proteica, la globina, y una porción no proteica, el hemo.

En una molécula de hemoglobina se identifican cuatro grupos hemo. Cada grupo hemo está constituido por un anillo tetrapirrólico en el centro del cual se sitúa un átomo de hierro ( $Fe^{++}$ ).

La biosíntesis del anillo tetrapirrólico se produce a partir de un aminoácido y un succinato activo, la succinil CoA. En la primera reacción la glicina se une con el succinil CoA y produce el ácido alfa-amino- $\beta$ -oxoadípico unido al enzima, el cual después se decarboxila a ácido  $\delta$ -aminolevulínico. Esta reacción la cataliza la  *$\delta$ -aminolevulinico-sintetasa*, enzima que requiere fosfato de piridoxal y que se encuentra en el retículo endoplasmático de las células hepáticas. Entonces dos moléculas de ácido  $\delta$ -aminolevulínico se condensan y forman porfobilinógeno, gracias a la actividad de la  *$\delta$ -aminolevulinico-deshidratasa*. El mecanismo de esta compleja reacción es muy interesante, implica la formación de una base de Schiff entre el grupo oxo de una molécula de ácido  $\delta$ -aminolevulínico y el grupo  $\Sigma$ -amino de un resto lisínico del enzima. Ambos enzimas la *sintetasa* y la *deshidratasa*, son enzimas inhibidas por el hemo, la hemoglobina y otras hemoproteínas, que son los productos finales de esta ruta biosintética.

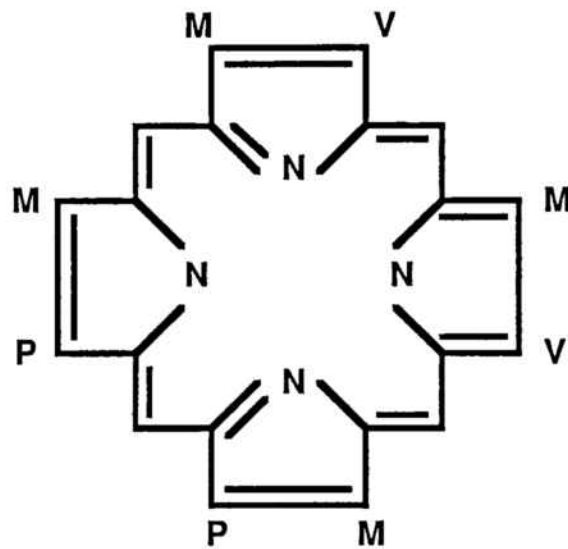
Como precursores de la protoporfirina actúan cuatro moléculas de porfobilinógeno, a través de una serie de reacciones complejas, la primera de las cuales cataliza la *porfobilinógeno-desaminasa*.

De la condensación de los cuatro anillos de porfobilinógeno y eliminación de  $\text{NH}_3$  se forma el anillo tetrapirrólico ( Uroporfirinógeno ). Este último sufre una decarboxilación en el grupo acetílico lateral, y se transforma por tanto en un residuo metilo - (  $\text{CH}_3$  ), el enzima que regula esta reacción, es la *uroporfirinógeno decarboxilasa*, formándose el Coproporfirinógeno III, que por decarboxilaciones y oxidaciones de dos residuos propiónicos en 2 y 4 se convierten en dos residuos vinílicos, el enzima que controla esta transformación es la *coproporfirinógeno oxidasa*. Se forma el protoporfirinógeno que por pérdida de 6 átomos de hidrógeno se convierte en protoporfirina, figura 8. El hierro no se incorpora a este tetrapirrol hasta que esta molécula tenga estructura de protoporfirina IX. Esta incorporación requiere un enzima, la *hemo-sintetasa o ferroquelatasa*, que está localizada en las mitocondrias, ( Leninger, 1982 ).

#### 1.5.1. La Cinc-Protoporfirina IX y la actividad $\delta$ - aminolevulinico deshidratasa intraeritrocitaria como indicadores de exposición laboral al Plomo inorgánico.

Los efectos del plomo sobre la síntesis del hemo, se han utilizado desde los años 50 como un método de screening del nivel de exposición a este metal.

El plomo que impregna distintos tejidos y órganos, mayoritariamente el tejido óseo, deprime la actividad de algunos sistemas enzimáticos cruciales para la síntesis del hemo en los eritroblastos de la médula ósea.

**PROTOPORFIRINA IX**

M : Metilo  
P: Propiónico  
V: Vinilo

**Figura nº 8**

Estos efectos se reflejan en incrementos de la concentración en sangre ( intraeritrocitaria ) de Acido  $\delta$ -aminolevulínico , Coproporfinas, Protoporfirina IX y Cinc-Protoporfirina IX, figura 9.

Lamola y Yamane (1974 ) identificaron que la ZPP era la forma quelada de la Protoporfirina IX libre y que era la protoporfirina predominante en las intoxicaciones por plomo, y que esta producía la mayor parte de la fluorescencia de los glóbulos rojos al efectuar estudios espectrofluorimétricos, figura 10.

El aumento de las porfirinas y especialmente de la ZPP en los trabajadores expuestos a plomo inorgánico, (Sassa y col., 1973 ), (Simmier y Chabert, 1983 ), ( Nordmann y Devars, 1984 ), se debe a una disminución de la actividad de la *hemosintetasa o ferroquelatasa*, que al no poder incorporar Hierro en el nucleo porfirínico, produce un aumento de la Protoporfirina IX. Esta a su vez, se transforma en ZPP al substituir el Fe por Zn, efecto que se ve potenciado por un aumento de la actividad de los enzimas  *$\delta$ -aminolevulínico - sintetasa* y  *$\delta$ -aminolevulínico -deshidratasa*, ( ALA-D ) al disminuir el efecto inhibitor que sobre estos enzimas ejerce su producto final, el hemo. El efecto de activación de la ALA-D , que produciría la disminución del hemo sobre este enzima, no se llega a producir, porque el plomo también inhibe la actividad ALA-D, ( Kajimoto y col., 1983 ), ( Koga y col., 1984 ) y ( Kondo y col. , 1983 ) , con el consiguiente aumento de ácido- $\delta$ -aminolevulínico, parámetros especialmente sensibles y ampliamente utilizados como marcadores de exposición laboral al plomo inorgánico.

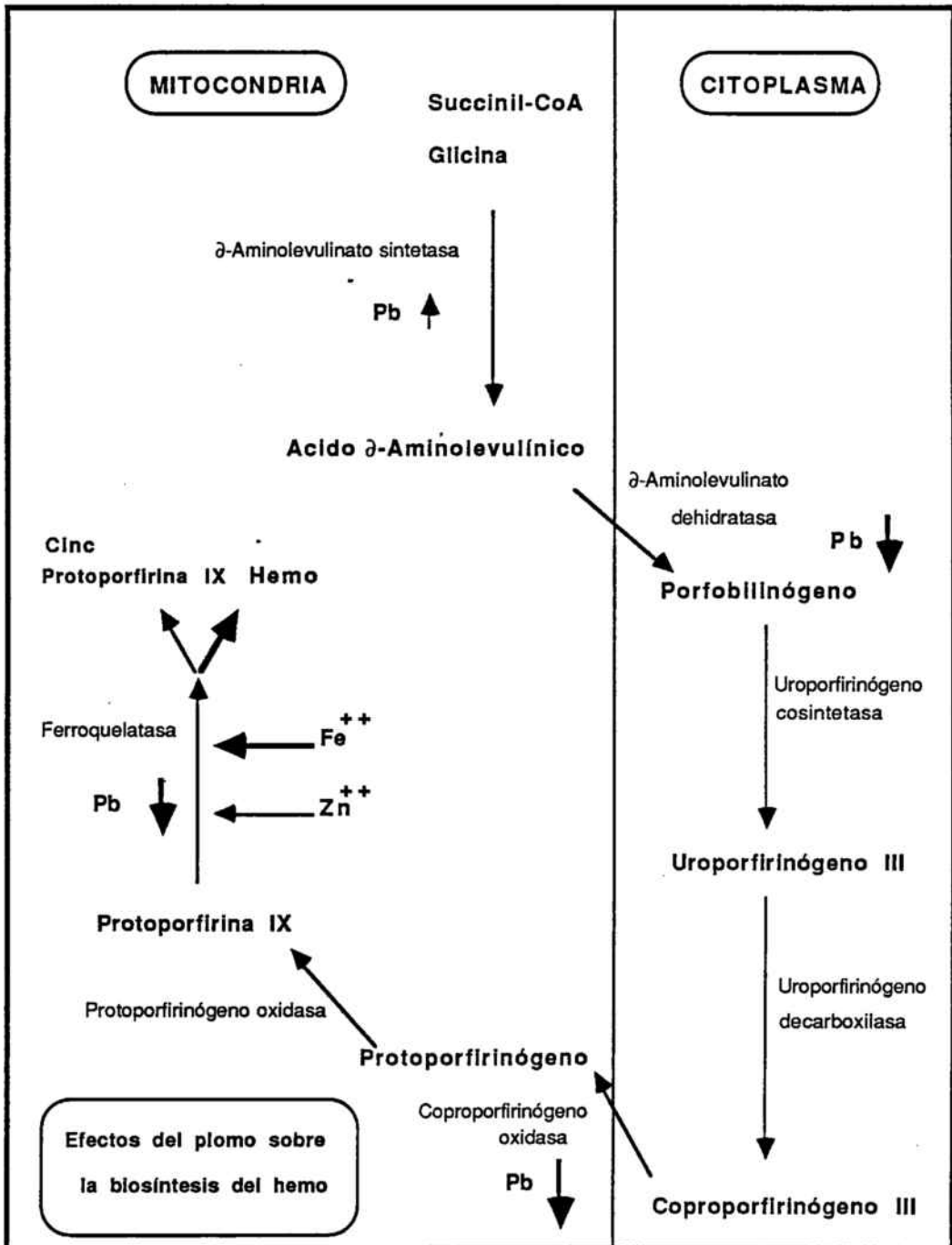
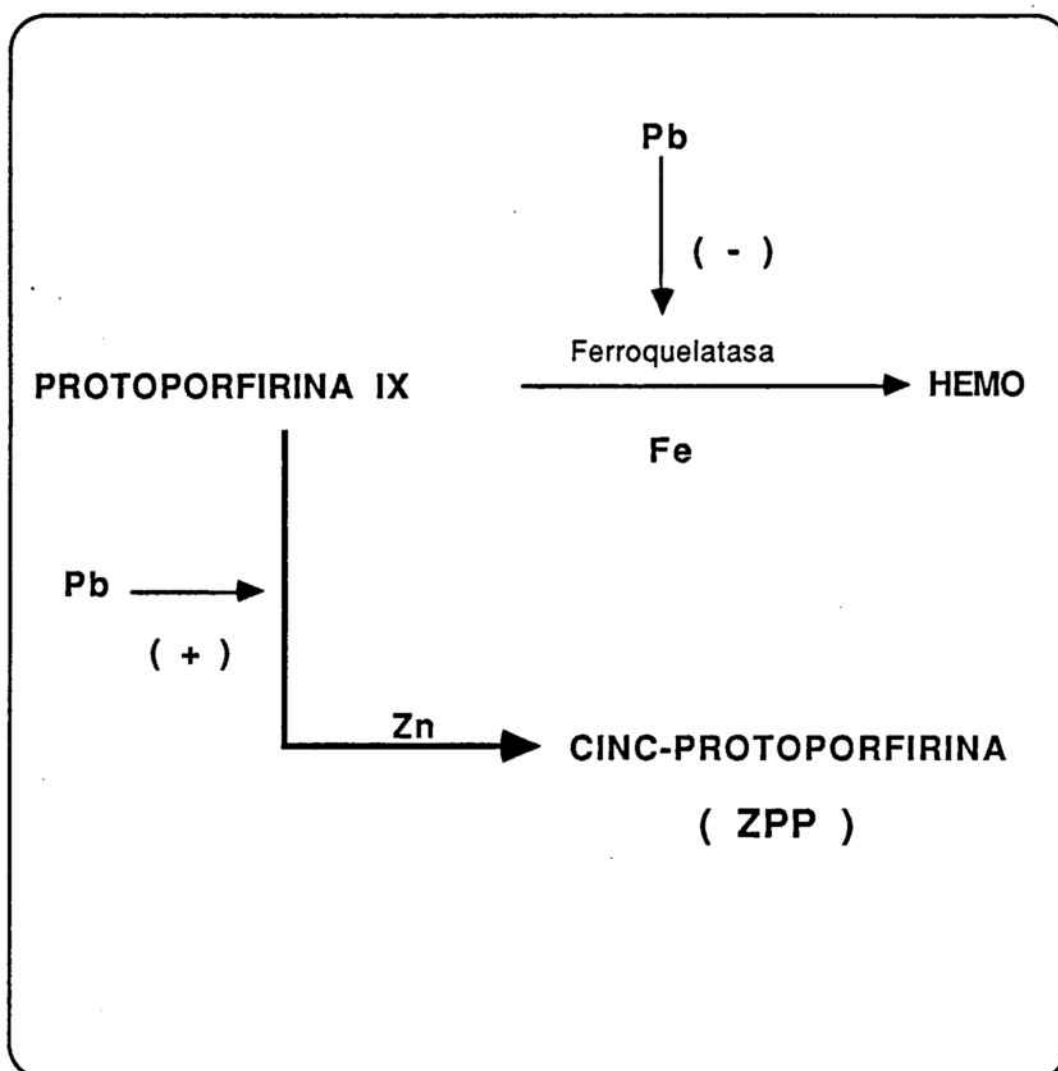


Figura nº 9

**INHIBICION DE LA ACTIVIDAD FERROQUELATASA  
POR EFECTO DEL PLOMO INORGANICO**



**Figura nº 10**

### 1.6. Síntesis de esteroides.

Casi todas las células del organismo pueden sintetizar esteroides del tipo C27 ( colesterol ). Pero sólo algunos tipos de células especializadas pueden romper la cadena del colesterol, convirtiéndolo en esteroides correspondientes a las series del pregnano ( C21 ), androstano ( C19 ), y estrano ( C18 ).

En el hombre, el córtex adrenal y los testículos son las únicas fuentes significativas de producción de esteroides ( C21 ), ( C19 ), ( C18 ). El primer paso en la síntesis de hormonas esteroideas desde el colesterol es la rotura de la cadena lateral de este esteroide para producir pregnenolona, figura 11.

Dependiendo de la concentración de enzimas, cofactores, substratos, productos finales, y otros factores, el cortex adrenal y el testículo utilizan distintas vías desde la pregnenolona para la síntesis de andrógenos. Cuando la configuración  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -ol de la pregnenolona se mantiene durante la conversión a dehidroepiandrosterona ( C19 esteroide ), via 17-hidroxipregnenolona, denominamos a este tipo de metabolismo como via del  $\Delta^5$ , figura 12. La via  $\Delta^4$  implica la conversión de pregnenolona a progesterona que mantiene la configuración  $\Delta^4$ -3-cetona, figura 13. Posteriormente el metabolismo de la progesterona redundante en la formación de androstendiona ( C19 esteroide ), via 17OH-progesterona.

En opinión de Guy. E. Abraham ( 1981 ), los esteroides C19 ( serie del androstano ) deben tener la configuración  $\Delta^4$ -3-cetona antes de



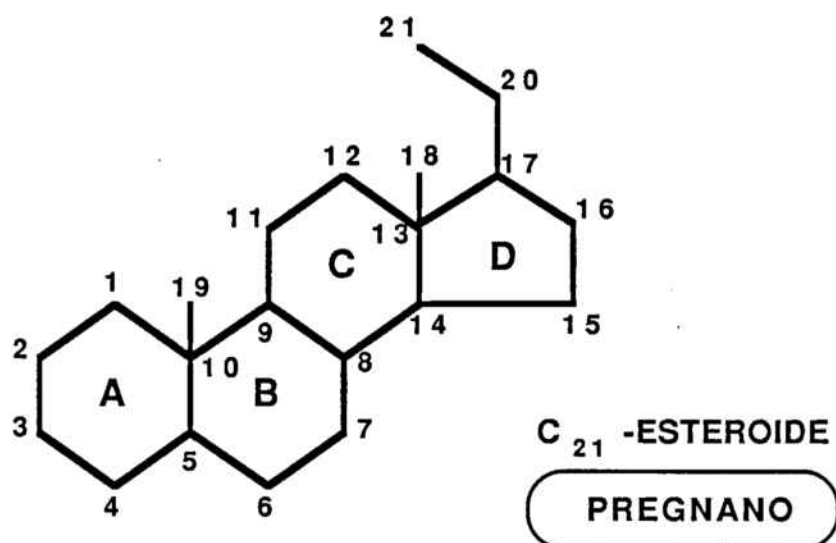
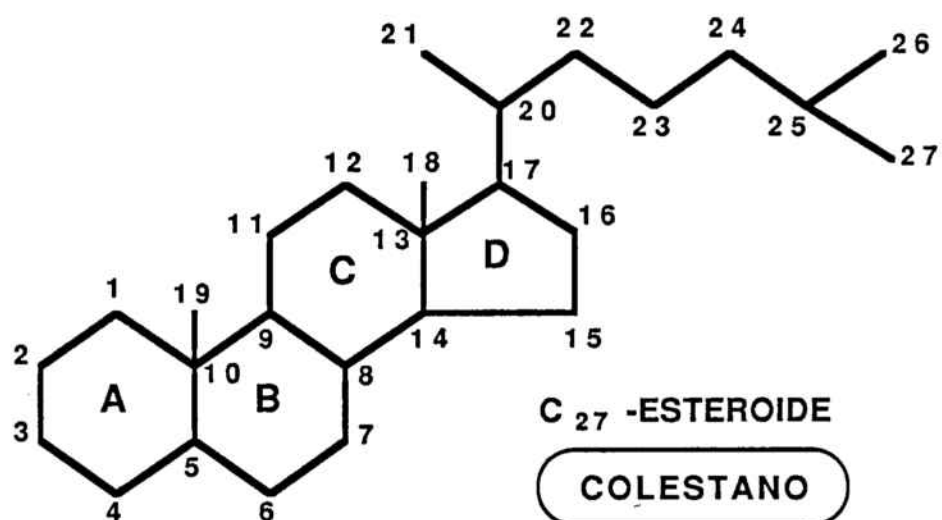


Figura nº 11

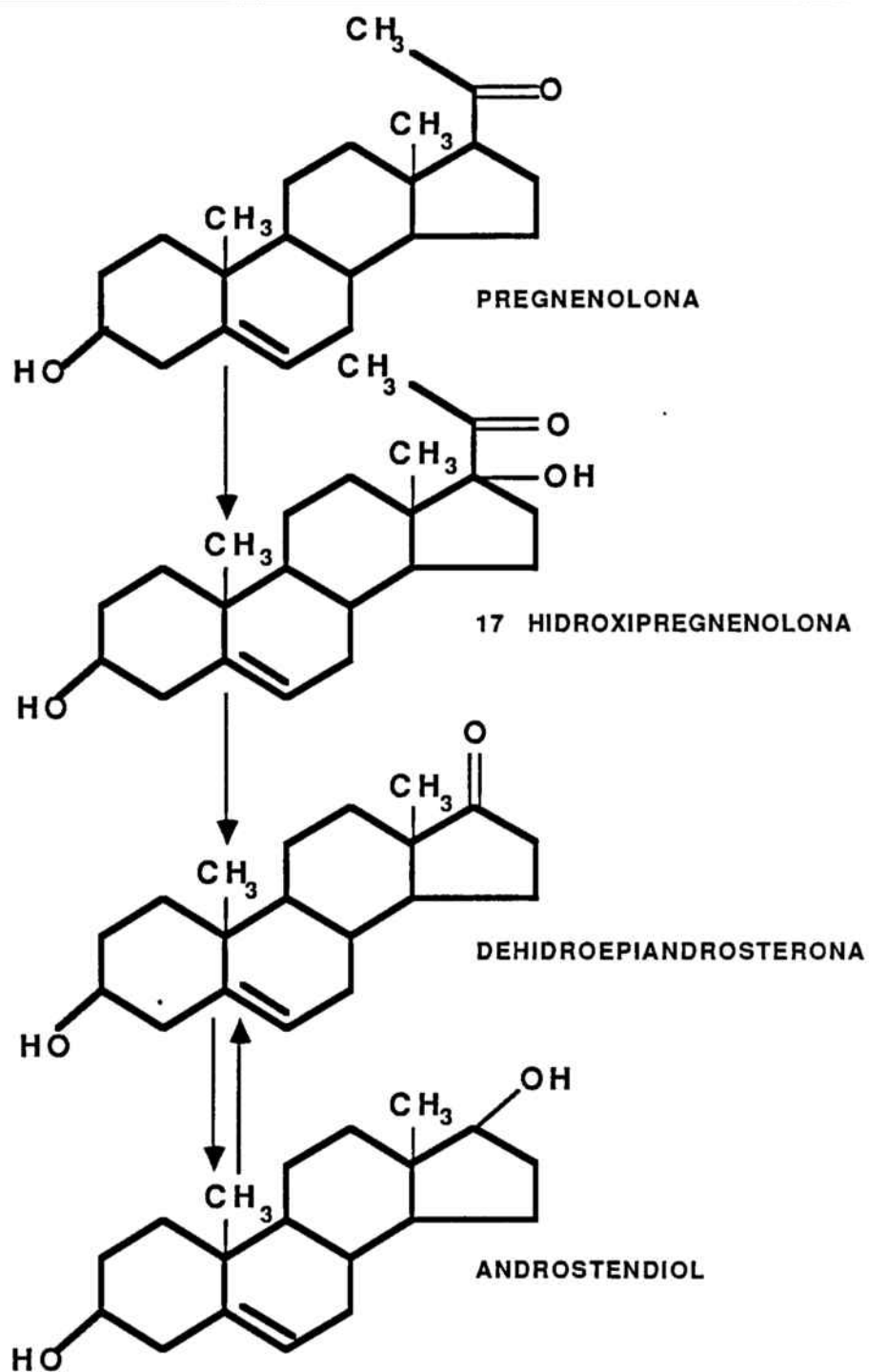
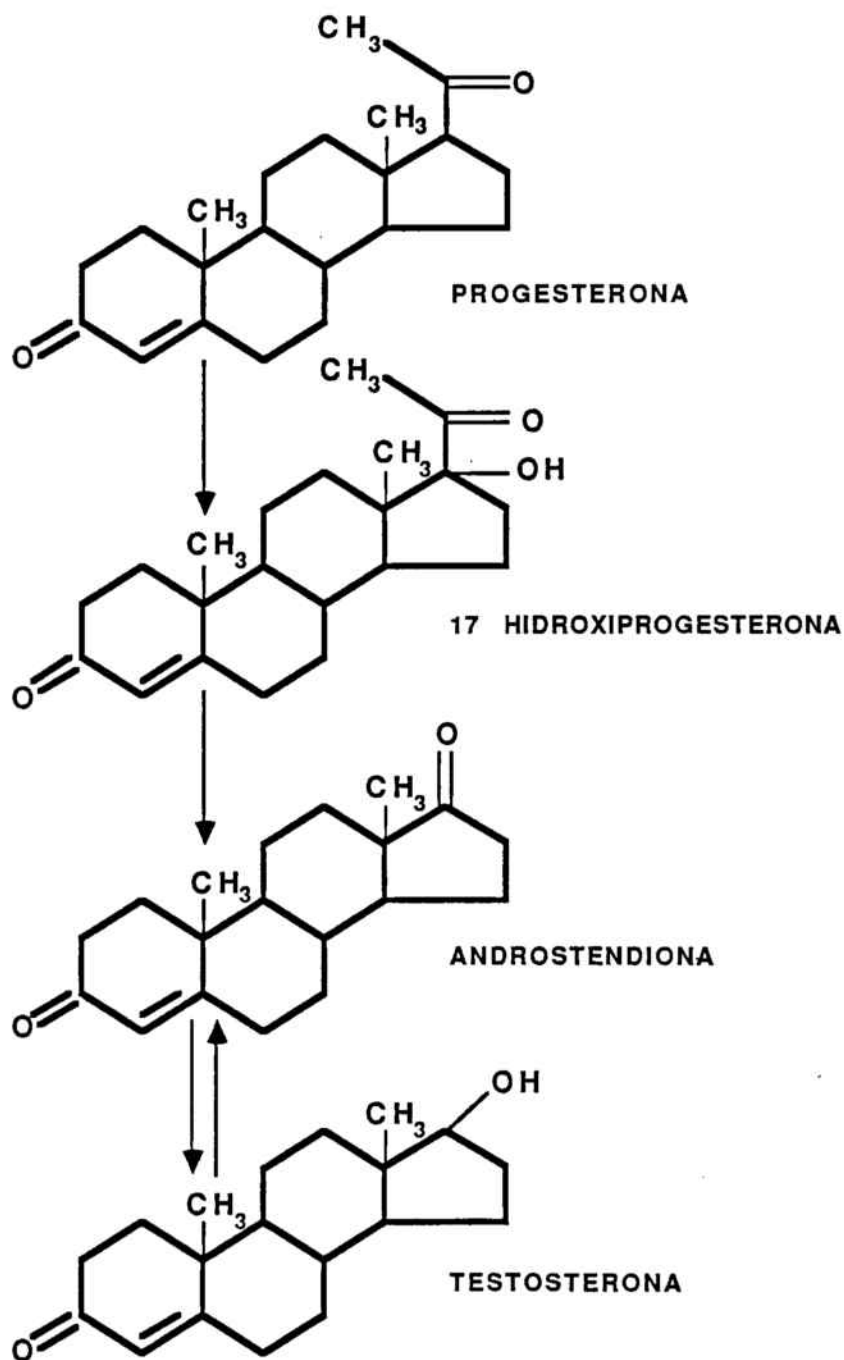
VIA  $\Delta^5$  DE LA SINTESIS DE ESTEROIDES

Figura nº 12

VIA  $\Delta^4$  DE LA SINTESIS DE ESTEROIDESFigura n<sup>o</sup> 13

aromatizarse a 17- $\beta$ -estradiol y estrona ( C18 estrógenos ).

Después de la síntesis, las hormonas esteroideas son segregadas a la circulación periférica, la mayor parte de ellas circulan unidas a proteínas plasmáticas, alcanzando los tejidos diana, donde ejercen su efecto. Actualmente se cree que únicamente pequeñas fracciones de hormonas esteroideas no ligadas a las proteínas plasmáticas son biológicamente activas.

### **1.7. Andrógenos.**

Los andrógenos inducen y mantienen la diferenciación, desarrollo y función del tracto genital masculino, así como de sus caracteres sexuales secundarios. A nivel de tejidos no sexuales, los andrógenos manifiestan ciertos efectos metabólicos con carácter anabolizante.

#### **1.7.1. Acción fisiológica.**

Estos esteroides determinan los caracteres de masculinización, esto es, mantienen la estructura y función normal de la próstata y vesículas seminales. Complementariamente, influyen en el desarrollo de los caracteres secundarios masculinos: distribución de vello y voz grave, ( Gower y Fotherby, 1973 )

El efecto metabólico general de los andrógenos es el de estimular el anabolismo proteico, traducándose en dos aspectos: disminución de la excreción de proteínas sin un incremento del nitrógeno no proteico en sangre , ( Baird, 1972 ), e incremento del peso corporal, debido en gran parte a un aumento en la masa de la musculatura esquelética,

( Becker y Snipes, 1968 ).

La androgenicidad de un esteroide es a veces medida utilizando ratas o ratones machos castrados, hasta que consumen, al cabo de un tiempo de espera, los andrógenos circulantes; posteriormente se valora el incremento de las vesículas seminales y próstata, tras la administración de una cantidad determinada de un compuesto a investigar, ( Gower, 1972 ).

### 1.7.2. Estructura esteroidea y androgenicidad.

Los compuestos naturales más importantes que poseen actividad androgénica ( todos los que son C19 esteroides ) son: la testosterona, 5alfa-dihidrotestosterona , 4-androstendiona y dehidroepiandrosterona sulfato.

Para que un C19 esteroide sea un andrógeno, precisa la presencia de un grupo oxígeno en posición 17 con una de las dos configuraciones siguientes: la 4-en-3-oxo ( como la testosterona ), o un grupo 3-oxo y un anillo A saturado ( como en la 5 alfa-dihidrotestosterona ). Si la función oxígeno en posición 17 está ausente, como en el 4,16-androstendieno-3-ona, la androgenicidad se pierde por completo, ( Gower, 1972 ). Si la oxidación del grupo 17 $\beta$ -hidroxilo ocurre para dar 17-oxoesteroide, como en el caso de la testosterona que se convierte a 4-androstendiona o de la 5-alfa-dihidrotestosterona a 5-alfa-androstano-3,17-diona, entonces, la androgenicidad puede, respectivamente, o ser muy reducida o perderse completamente.

El grupo 3-oxo es también necesario para manifestar androgenicidad, así; un compuesto semejante, la 5 alfa-androstano-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol tiene un 60 % de la potencia de la testosterona, aún cuando el 17-hidroxilo esté intacto en este caso.

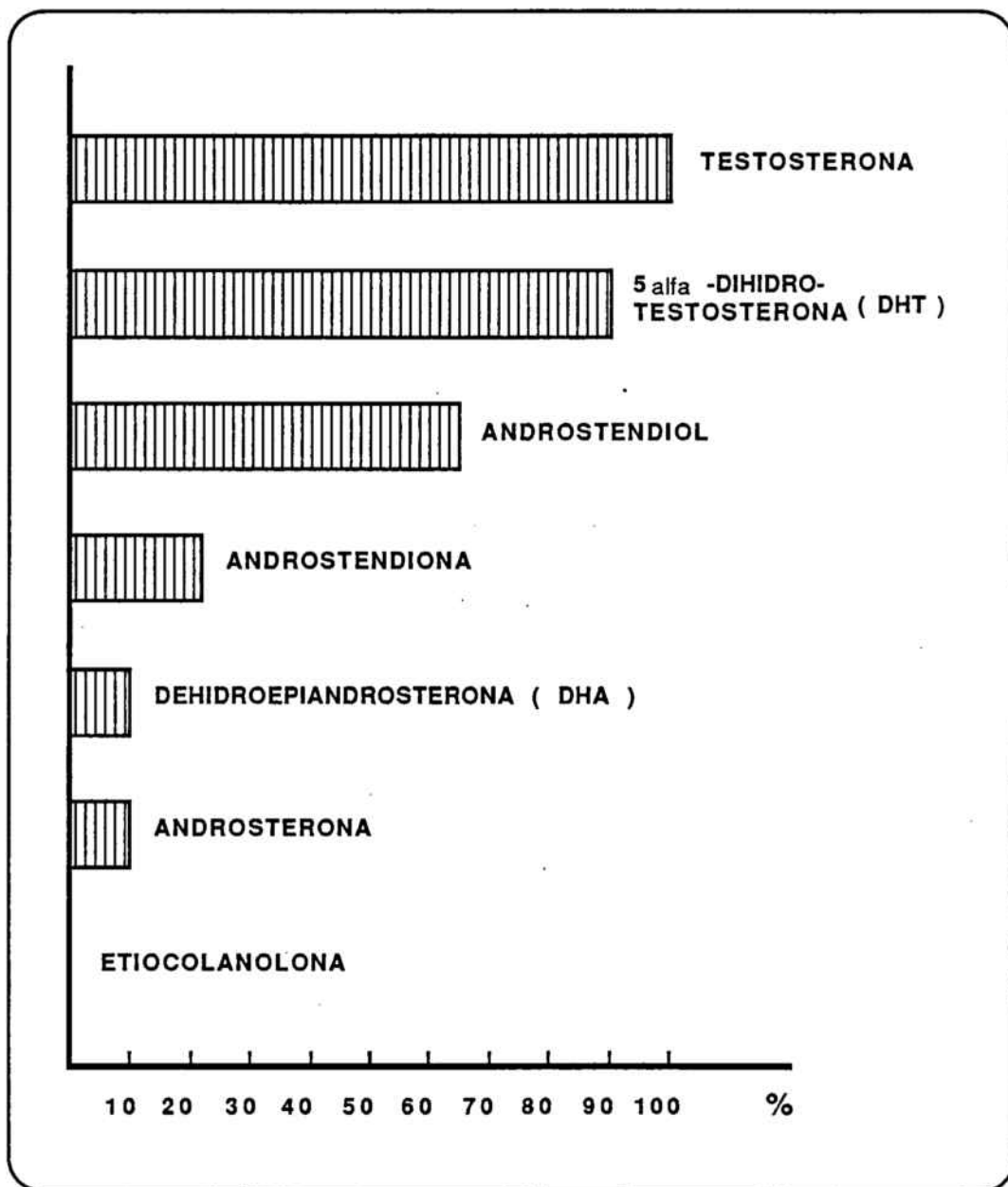
Otros C19 esteroides, como la androsterona, eticolanolona y DHA, tienen poca o nula potencia androgénica, figura 14.

### 1.7.3. Biosíntesis.

La biosíntesis de andrógenos se produce fundamentalmente en los testículos y córtex adrenal, y de forma limitada en los ovarios y placenta, aunque los estrógenos producidos en estos tejidos inhiben indirectamente la conversión de la 4-androstendiona a testosterona. En el varón las células de Leydig, del tejido intersticial de los testículos son responsables de la mayor parte de la producción de andrógenos. La proporción de tejido intersticial varía enormemente en los testículos de diferentes especies; en la familia de los cerdos es de un 40-50 % como máximo, mientras que en cobayos, ratas, ratones y humanos, la proporción no es mayor de un 10 %. Durante los últimos años, algunos autores han logrado separar los túbulos seminíferos del tejido intersticial en testículos de ratas y han mostrado que algunas transformaciones de esteroides se producen allí.

En el córtex adrenal, la zona fasciculata y la zona reticular contienen importantes sistemas enzimáticos para la biosíntesis de andrógenos.

Hace muchos años, la testosterona fué aislada inicialmente de testículos de varias especies, incluyendo toros, caballos, cerdos y



ACTIVIDAD ANDROGENICA ( respecto de la testosterona ) DE  
ALGUNOS C<sub>19</sub> ESTEROIDES NATURALES.

Figura nº 14

hombres, dando así una indicación temprana de que esta glándula estaba implicada en la síntesis de andrógenos.

Para la investigación de estas vías biosintéticas se han utilizado métodos aceptados y descritos para los corticosteroides, como la incubación o administración de grandes cantidades de precursores de esteroides. Posteriormente, la disponibilidad de isótopos radiactivos hizo posible la puesta en marcha de nuevos diseños experimentales sobre la fisiología de los andrógenos.

La biosíntesis de andrógenos por las células de Leydig es estimulada por la Hormona luteinizante ( LH ). La unión de la LH a los receptores específicos de alta afinidad en la superficie de las células de Leydig, ( Catt y col., 1972 ), produce un incremento de la producción de AMPc intracelular ,( Dufau y col., 1973 ), y activación de las protein-kinasas AMPc dependientes, ( Cooney col., 1976 ), ( Dufau y col., 1977 ). La esteroidogénesis de las células de Leydig puede ser estimulada también por la gonadotropina coriónica humana ( hCG ), un análogo de la LH, pudiendo unirse a los enlaces de los receptores de LH, ( Dufau y col., 1977 ), y por análogos del AMPc, ( Tsuruhara y col. , 1977 ), ( Cooke y col., 1977 ). Aunque el mecanismo exacto no es conocido, la estimulación del AMPc se cree que produce un incremento en la tasa de captación del substrato, colesterol, con la activación de la enzima mitocondrial de segmentación de la cadena lateral del colesterol ( P-450 scc ), ( Hall, 1970 ), ( Van der Vusse y col., 1975 ). El colesterol es segmentado por la P-450 scc para producir pregnenolona ( esteroide C21 ), que posteriormente se metaboliza a



testosterona por enzimas asociados al retículo endoplasmático liso. La  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa-isomerasa , ( enzima no perteneciente a la P-450 ), cataliza la conversión de pregnenolona a progesterona. La conversión de la progesterona ( C21 esteroide ), a androstendiona ( C19 esteroide ), es catalizada por los enzimas de la P-450C17, la 17alfa-hidroxilasa y la C 17-20,liasa o desmolasa, figura 15.

El transporte de estos precursores androgénicos del retículo endoplasmático liso a las mitocondrias y viceversa, lo realiza una proteína hialoplasmática ( esqualene and esterol carrier protein ) ,que transporta estos esteroides de una estructura membranosa a otra, ( Berkaloff y col., 1986 ).

#### 1.7.4. Origen de los andrógenos plasmáticos en el hombre adulto.

El testículo produce el 95 % de la testosterona plasmática, el 5 % restante proviene de la conversión periférica de la androstendiona, ( Lipsett y col., 1966 ).

Los testículos segregan el 20 % de la Dihidrotestosterona ( DHT ), y el 80 % restante proviene de la conversión periférica de la testosterona, ( Ishimaru y col., 1977 ), ( Vermeulen y Ando., 1979 ).

El androstendiol proviene de la conversión periférica de la testosterona, ( Mahoudeau y col., 1971 ).

La androstendiona tiene un origen mixto : el 50 % proviene de las suprarrenales y el 50 % de los testículos, ( Longcope, 1973 ).

ACTIVACION DE LA SINTESIS DE TESTOSTERONA EN  
LAS CELULAS DE LEYDIG POR EFECTO DE LA LH

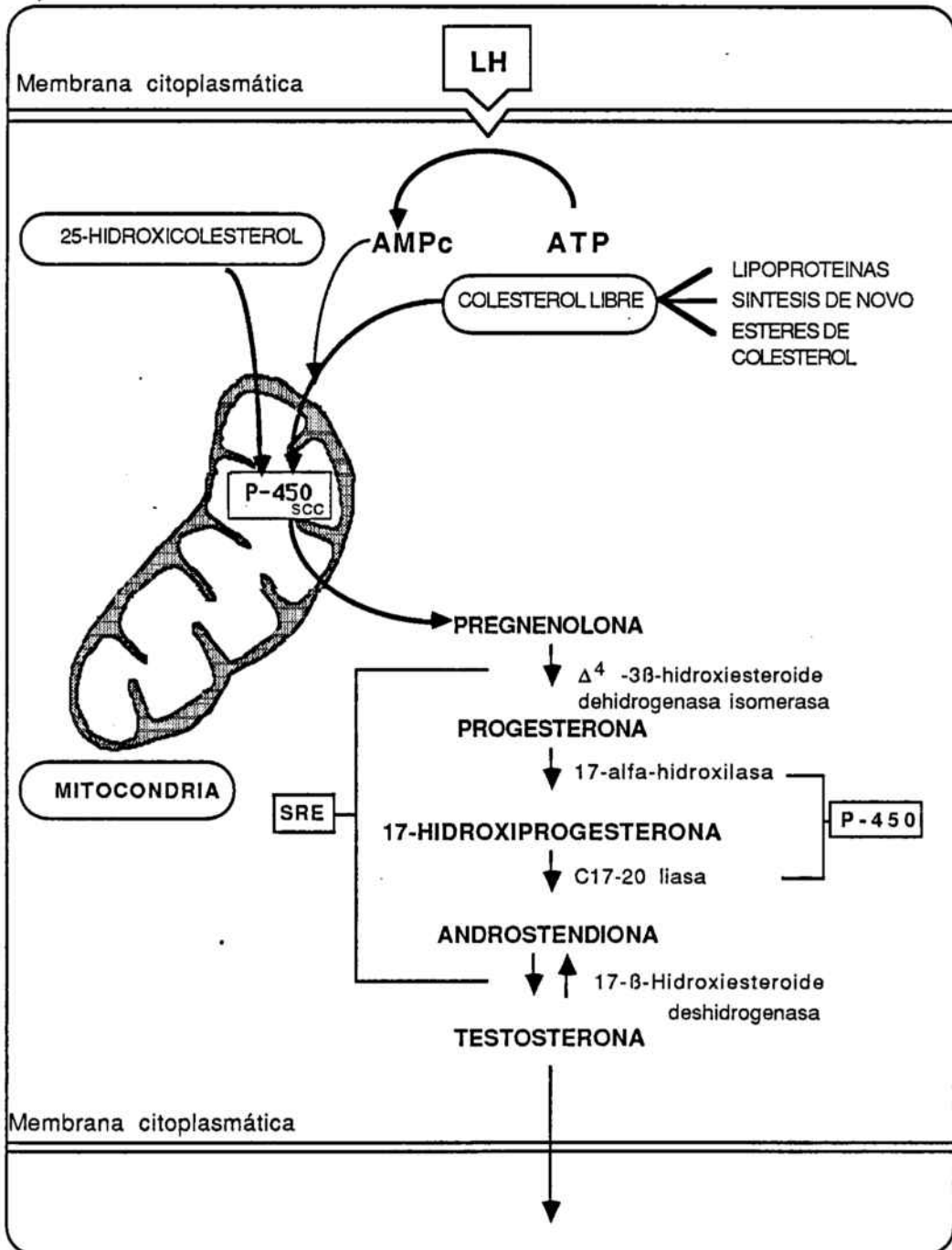


Figura nº 15

La dehidroepiandrosterona tiene un origen esencialmente suprarrenal, sólo el 30 % proviene de los testículos, Laatikainen y col. ( 1971 ).

La dehidroepiandrosterona sulfato está considerada como un andrógeno puramente suprarrenal, pero una fracción importante, el 60 % de la cantidad producida, proviene de la sulfatación de la dehidroepiandrosterona, ( Baulieu y col., 1965 ), ( Bird y col., 1978 ).

El androstendiol parece ser un metabolito de la dehidroepiandrosterona ( 60 % ), pero una fracción importante ( 40 % ) la segregan las células de Leydig, ( Demisch y col., 1973 ).

#### 1.7.5. Transporte plasmático de Andrógenos.

Los andrógenos plasmáticos están fuertemente unidos a las proteínas. Una de estas proteínas es una  $\beta$ -globulina, de alta afinidad pero escasa capacidad de transporte para los andrógenos, denominada "protéine liant la testosterone ( PLT ), testosterone estradiol binding globulin ( TeBG ) o sex hormone binding globulin ( SHBG )", que nosotros denominamos "proteína transportadora de esteroides sexuales ( SBG )", ( Mercier y col., 1966 ), ( Pearlam y Crepy., 1967 ), ( Vermeulen y col., 1969 ).

Esta proteína tiene una fuerte afinidad por los esteroides hidroxilados en 17  $\beta$ .

La transcortina es una proteína que transporta específicamente el cortisol, la corticosterona y la progesterona, a la que se pueden unir andrógenos hidroxilados en 17  $\beta$ , pero que a la temperatura fisiológica del cuerpo humano ( 37 ° C ), la afinidad es muy débil, de manera que, la

cantidad de testosterona y dihidrotestosterona unida a esta proteína es despreciable.

La albúmina tiene escasa afinidad, pero presenta una capacidad de unión prácticamente ilimitada para las hormonas esteroideas. La mayor parte de autores aceptan que en el hombre sano, alrededor de un 2 % de la testosterona plasmática se encuentra en forma libre ( no ligada a proteínas plasmáticas ), un porcentaje similar está unida a la transcortina, el 40 % está unida a la albúmina, y aproximadamente un 55 % a la SHBG, ( Vermeulen y col., 1971 ).

Toda los datos fisiológicos de que disponemos en la actualidad parecen indicar que sólomente la fracción androgénica no ligada a proteínas específicas es biológicamente activa. En efecto, existe una clara correlación entre la fracción libre de andrógenos y su aclaramiento metabólico, ( Vermeulen y col., 1971 ).

La testosterona libre es mejor parámetro de androgenicidad que la testosterona total, ( Rosenfield, 1971 ), ( Vermeulen y col., 1971 ).

La conversión de testosterona a DHT y de androstendiona a testosterona, depende de la fracción libre de testosterona, (Vermeulen y Ando, 1979 ).

### 1.8. Mecanismos de regulación del eje hipotálamo - hipófiso - testicular .

La función testicular está definida por la producción de andrógenos, ( fundamentalmente la testosterona ) y por la producción de espermatozoides. Para su desarrollo y correcto funcionamiento, el testículo depende de la secreción hipofisaria de la LH y de la FSH.

Esta secreción hipofisaria depende a su vez del hipotálamo, situado en el sistema nervioso central, que segrega el factor liberador de las gonadotrofinas ( G.n.R.H. ), el cual llega a la hipófisis por medio de la circulación portal, específica de la zona.

Este eje que hemos descrito " Hipotálamo-hipófiso-testicular. " está muy relacionado entre sí, de modo que se ejerce una autorregulación a todos los niveles. De forma esquemática, la acción primordial de la LH, es la estimulación de las células testiculares productoras de testosterona , células de Leydig , mientras que la FSH actuaría sobre los túbulos seminíferos estimulando la espermatogénesis.

De todas formas, la acción de las gonadotrofinas sobre el testículo no es completamente independiente. Así, para una normal espermatogénesis, son necesarias elevadas concentraciones de testosterona intratesticular y la acción estimuladora de la LH sobre las células de Leydig, potenciada por la FSH.

Siguiendo con esta descripción esquemática, la función testicular ejerce una retroalimentación negativa sobre la secreción de LH y FSH. La retroalimentación de la LH se efectúa fundamentalmente por la testosterona y el estradiol, y la de la FSH, parece estar regulada por una sustancia no muy bien catalogada: la Inhibina, secretada por los túbulos seminíferos ( concretamente las células de Sertoli ).

### 1.9. Valoración de la función endocrina testicular.

La valoración de los 17-cetosteroides, empleada antiguamente, está en la actualidad totalmente desechada, ya que no refleja la producción de testosterona, y sí la de otros esteroides de origen suprarrenal.

El mejor indicador de androgenicidad, así como de la función testicular en el hombre es la testosterona libre sérica, ( Rosenfield, 1971) y ( Vermeulen y col., 1971), que puede determinarse por metodología muy laboriosa, o bien, como en nuestro caso, valorando la testosterona total sérica y la steroid - binding - globulin ( SBG o proteína transportadora de esteroides sexuales ) . La relación de ambos parámetros ( cociente Testosterona/ SBG ), nos determina el índice de testosterona libre.

En animales de experimentación pueden utilizarse para la valoración de la función testicular, los niveles de testosterona libre sérica y/o intratesticular. Esta información puede complementarse en testículo , mediante la determinación de los precursores de la vía  $\Delta^4$  de la síntesis de esteroides : ( Progesterona, 17OH-Progesterona, Androstendiona y Testosterona ).

### 1.10. Efectos del plomo inorgánico sobre la función testicular.

En el capítulo histórico se comentaban las alteraciones observadas por algunos autores sobre la libido masculina, pero es a partir del siglo XX cuando encontramos descripciones sobre alteraciones del eje hipotálamo-hipófiso-testicular, y más concretamente sobre la fertilidad en animales de experimentación y en el hombre, en publicaciones periódicas científicas.

Los primeros trabajos publicados en revistas científicas fueron los de Cole y Bachhuber ( 1914 ), sobre los efectos del plomo en las células germinales de conejo y aves machos a través de los indicadores de pro genie, así como un trabajo de Oliver (1914 ).

Más tarde, Morris y col.( 1938 ), describen los efectos sobre el crecimiento y reproducción en ratas alimentadas con dietas que contenían acetato de plomo y trióxido de arsénico.

En la actualidad existen suficientes evidencias de que el plomo puede ejercer acción tóxica sobre el sistema reproductor humano. Se han descrito efectos espermatotóxicos y gonadotóxicos en varias especies animales, incluyendo al hombre, ( Puhac y col., 1963 , Sandstead y col., 1970 , Eyden y col., 1978 , Bell y Thomas, 1982 , Kendall y col. , 1981 , Hildebrand y col., 1973 , Varma y col., 1974 ., Brausntein y col., 1978 ).

También se han observado alteraciones cromosómicas en trabajadores expuestos, confirmados en población infantil y en animales de experimentación, (Bauchinger y col.,1976, 1977 , De Knudt y col., 1973, 1977 , O'Riordan y Evans , 1974 , Nordenson y col.,

1978, 1982 ).

Lacranjan y col. ( 1975 ), describieron alteraciones androgénicas como astenospermia, oligospermia y teratospermias, con insuficiencia del epitelio germinal en trabajadores expuestos a Pb inorgánico, que podrían explicarse por un efecto tóxico directo del plomo sobre las gónadas; pero no apreciaron diferencias significativas en las tasas de 17-cetosteroides ni gonadotrofinas totales en orina de 24 horas. Datos experimentales obtenidos por Eyden y col. ( 1978 ) en ratones machos Balb C, parecen evidenciar un aumento significativo del número de espermatozoides anormales tras exposición al acetato de plomo, contenido en la dieta.

Otros autores como Thomas y col. ( 1981 ), han observado que el plomo puede inhibir directamente la unión de la dihidrotestosterona a los receptores androgénicos de los órganos anejos masculinos, al igual que otros cationes divalentes como , Cu, Hg, Zn y Cd, datos semejantes a los obtenidos por Donovan y col. ( 1981 ).

Un trabajo reciente de Cullen y col. (1983 ), sobre intoxicación por plomo inorgánico en adultos, complementado por una revisión exhaustiva del tema, nos muestra los parámetros alterados de distintos sistemas orgánicos de trabajadores expuestos. De los estudios endocrinológicos, y especialmente del eje hipofiso-testicular, los resultados obtenidos son: 1 caso de entre 8 trabajadores con 17-cetosteroides disminuidos, 1 caso de testosterona baja sobre un total de 8 analizados, 1 caso de LH y FSH aumentadas de un total de 13 estudiados y un total de 2 azoospermias y 3 oligoespermias de 7 espermigramas realizados.

Braunstein y col. en 1978, observan en un grupo de 10 trabajadores



expuestos al plomo inorgánico una disminución significativa de la testosterona basal, con niveles normales de Proteínas transportadoras de esteroides ( SBG ), estradiol, prolactina , LH y FSH. En este mismo trabajo no se observan diferencias significativas en estos trabajadores, respecto del grupo control, en los niveles de testosterona tras estimulación con hCG, ni en los de FSH tras estimulación con citrato de clomifeno y GnRH; sin embargo, un grupo de seis trabajadores intoxicados por plomo, con manifestaciones clínicas, mostraron una reducción significativa del incremento de los niveles de LH séricos, tras la administración de citrato de clomifeno y GnRH, respecto de cuatro trabajadores expuestos y el grupo control.

En un trabajo posterior de Cullen y col. ( 1984 ), no encuentran diferencias significativas en los niveles de testosterona en siete trabajadores con intoxicación sintomática al plomo, pero sí importantes defectos de la espermatogénesis en cinco, dos con oligospermias y dos con azoospermias.

Un trabajo experimental de Sokol y col.( 1985 ), en ratas Wistar, expuestas a 0.0 %, 0.1 %, y 0.3 % de acetato de plomo en el agua de bebida, durante 30 días, describe una correlación negativa de los incrementos de los niveles de plomo en sangre y testosterona (  $r = -0.64$   $p < 0.001$  ), similar correlación negativa en plomo en sangre y testosterona intratesticular (  $r = -0.69$   $p < 0.001$  ), sin cambios significativos de la LH respecto del grupo control y una FSH significativamente reducida (  $p < 0.05$  ).

## **2. OBJETIVOS.**

## 2.OBJETIVOS.

Las discrepancias entre distintos autores sobre los efectos del plomo inorgánico en el eje hipotálamo-hipófiso-testicular, así como la experiencia en colectivos de trabajadores expuestos a plomo inorgánico y resultados provisionales obtenidos en algunos trabajos experimentales en ratones Balb C, obligan a plantear las siguientes preguntas :

a.- ¿ La acción del plomo inorgánico sobre el eje Hipotálamo-Hipófiso-Testicular, se debe a un efecto central ( Hipotalamo-hipófisis, con disminución de LH y Testosterona ), o es un efecto a nivel periférico ( testicular, con bloqueo de la síntesis de Testosterona y aumento de la LH. ) ?.

b.- ¿ Han de realizarse todos los ensayos a un mismo tiempo de exposición, para que estos puedan ser comparables ?. Recordemos que la mayoría de los ensayos experimentales se realizan a punto final a 1 o 2 meses e incluso a otros tiempos de exposición, una o dos semanas.

c.- ¿ Cuales son las concentraciones necesarias de acetato de plomo en el agua de bebida, para reproducir un modelo experimental próximo y adecuado al que están sometidos los trabajadores expuestos, teniendo en cuenta que la via inhalatoria es la mayoritaria ?. Las concentraciones utilizadas en la mayoría de ensayos oscilan entre los 0.25 y 1.0 g/L de acetato de plomo en el agua de bebida.

d.- ¿ Los niveles de plomo en sangre son un buen indicador del grado de absorción del animal de experimentación ?. Los niveles alcanzados por distintos autores oscilan entre los 14  $\mu\text{g/dL}$  y los 142  $\mu\text{g/dL}$ .

e.- ¿ Los niveles de Pb en sangre expresan adecuadamente las concentraciones de este producto en tejidos ?. La experiencia en ensayos experimentales indica que la concentración de este metal en sangre, no manifiesta su contenido en tejidos y que ésta depende de dos factores: niveles de plomo en el agua de bebida y tiempo de exposición.

f.- ¿ Por qué la mayoría de los trabajos experimentales intentan siempre correlacionar la disminución de fertilidad o testosterona con las concentraciones de Pb en sangre ?.

Está admitido universalmente que hay mejores indicadores de exposición al plomo que la plumbemia, como la Cinc-Protoporfirina IX, Protoporfirina IX libre, actividad ALA-D, etc.

g.- ¿ Por qué hay tan pocos datos experimentales sobre concentraciones de plomo en cerebro, áreas cerebrales, hipotálamo e hipófisis, si la supuesta acción es central; o de plomo en testículo si la acción es periférica, o de este metal en distintos tejidos, cuando muchos órganos desempeñan un importante papel en el metabolismo hormonal ?.

h.- Si aceptamos los supuestos f y g, sería absurdo aceptar los resultados de un ensayo a 30 días, con sus conclusiones, así como los efectuados puntualmente a 60 días. A mi criterio deberían efectuarse diferentes ensayos a distintos tiempos de exposición ( mensualmente ) en las mismas condiciones y hasta un mínimo de seis meses en ratones Balb C machos.

Para intentar responder a todas las cuestiones planteadas anteriormente, es necesario diseñar un modelo experimental que

teniendo en cuenta la realidad de la población laboral expuesta, nuestra experiencia sobre el tema y los resultados de algunos ensayos experimentales realizados a corto plazo, pueda aclararlas.

### 2.1. Objetivos que se pretenden alcanzar en población laboral expuesta.

En este estudio se propone valorar en un grupo de 48 trabajadores seleccionados de un colectivo de una fundición de plomo, con edades comprendidas entre los 25 y los 50 años y sin síntomas clínicos de intoxicación por plomo ( neuropatía periférica, gota saturnina, encefalopatía, dolores cólicos abdominales, etc. ), tabla II.

1.- Valorar si se producen cambios en los niveles de testosterona sérica, valorando la testosterona total y el índice de testosterona libre [ mediante la relación de la testosterona total y la steroid-binding-globulin ( SBG )].

2.- Determinar LH y FSH en plasma. Si los cambios de los niveles de testosterona se debieran a mecanismos específicos de su síntesis, se producirían alteraciones del eje hipotálamo-hipofiso-testicular, que desencadenarían modificaciones de la LH y/o FSH.

3.- Investigar la actividad suprarrenal ( Glucocorticoides -C21 ) y Andrógenos -C19 ), al mismo tiempo que la actividad androgénica testicular, mediante la determinación del cortisol basal ( a las 8 horas de la mañana ), la dehidroepiandrosterona-sulfato y la testosterona. Si estos parámetros se encontraran alterados en un mismo sentido, se

**OBJETIVOS EN POBLACION LABORAL EXPUESTA**

**VALORACION DE LA TOXICIDAD DEL PLOMO INORGANICO,  
SOBRE LA FUNCION ENDOCRINA TESTICULAR**

**A.- Cuantificación de la posible disfunción**

**B.- Relacionar con:**

**1.- Grado de impregnación por plomo**

**2.- Tiempos de exposición**

**Tabla nº II**

confirmaría la hipótesis de una alteración global de la síntesis de esteroides.

4.- Realizar determinaciones de los parámetros específicos de exposición laboral, plomo en sangre, y el marcador biológico Cinc-protoporfirina ( ZPP ), seleccionado por su gran sensibilidad y especificidad en las intoxicaciones laborales por plomo inorgánico.

5.- Evaluar adecuadamente los efectos del plomo sobre este eje endocrinológico, teniendo en cuenta que las modificaciones hormonales precisan de una acción intensa y prolongada; a tal fin se dividirá la población laboral en tres grupos;

Grupo 1 .- Trabajadores expuestos por primera vez al plomo, con una antigüedad inferior a 1 año.

Grupo 2 .- Trabajadores expuestos crónicamente al plomo, con una antigüedad en su puesto de trabajo de 1 a 5 años.

Grupo 3 .- Trabajadores expuestos crónicamente al plomo, con una antigüedad en su puesto de trabajo superior a los 5 años.

6.- Realizar un seguimiento de estos tres grupos de trabajadores, mediante análisis semestrales de los parámetros descritos, a lo largo de un año o del período de tiempo de vigencia de su contrato laboral en el grupo 1.

7.- Evaluar si existen diferencias significativas entre la población expuesta y el grupo control, de los parámetros hormonales, concentración de plomo en sangre y marcadores biológicos de exposición laboral, y valorar las posibles correlaciones entre estos parámetros y el tiempo de exposición.

## 2.2. Objetivos que se pretenden alcanzar en animales de experimentación.

1.- Determinar los niveles de plomo en sangre y tejidos ( cerebro, testículo, riñón, hueso e hígado. ), de ratones machos Balb C, mensualmente y a lo largo de seis meses de exposición a 366 mg/L de acetato de plomo en el agua de bebida ( 1000  $\mu\text{g}/\text{día}$  ), niveles inferiores a los descritos en la literatura, frente a un grupo control al que se le suministra agua destilada como agua de bebida.

2.- Valorar mensualmente y a lo largo de estos seis meses las concentraciones de Cinc-Protoporfirina IX y ALA-D, en la sangre de los ratones estudiados.

3.- Determinar mensualmente los niveles de Progesterona, 17OH- Progesterona, Androstendiona y Testosterona ( vía  $\Delta^4$  del metabolismo de los esteroides ) , en testículo, durante el tiempo de duración del ensayo, tabla III.

4.- Evaluar mensualmente si existen diferencias significativas de los distintos parámetros estudiados, entre los grupos controles y los grupos tratados con acetato de plomo.

5.- Correlacionar:

- a) Plomo en tejidos con Cinc-Protoporfirina IX en sangre.
- b) Niveles de Testosterona en testículos, con niveles de plomo en testículos.
- c) Concentración tisular de plomo con tiempo de exposición.



**OBJETIVO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION**

**VALORAR LA ALTERACION DE LA FUNCION ENDOCRINA  
TESTICULAR POR EFECTO DEL PLOMO INORGANICO  
A LO LARGO DE UN ENSAYO EXPERIMENTAL DE SEIS  
MESES EN RATONES BALB/C +, DETERMINANDO :**

- 1.- Los niveles hormonales intratesticulares de la vía  $\Delta^4$  de la síntesis de esteroides ( Progesterona, 17OH-Progesterona, Androstendiona y Testosterona. )**
- 2.- Concentraciones de Pb en sangre y tejidos.**
- 3.- Actividad ALA-D y niveles de ZPP en sangre**

### **3. MATERIAL Y METODOS.**

### 3.1.Descripción del estudio en población laboral expuesta.

#### 3.1.1.1.Población estudiada.

El grupo expuesto lo constituyen 46 varones con edades comprendidas entre los 21 y 52 años, trabajadores de una fundición de baterías de plomo que en función del tiempo de exposición se dividen en tres grupos : grupo 1 : tiempo de exposición inferior a un año, N = 10 trabajadores con edades comprendidas entre los 21 y los 44 años (  $30\pm 9$  ), grupo 2 : tiempo de exposición superior a un año e inferior a cinco, N = 15 trabajadores con edades comprendidas entre los 21 y los 46 años (  $33\pm 12$  ), grupo 3 : tiempo de exposición superior a cinco años, N = 21 trabajadores con edades comprendidas entre los 25 y los 52 años (  $34\pm 10$  ). El grupo control lo constituyen 40 varones sanos, trabajadores de nuestro hospital, con edades comprendidas entre los 20 y 60 años (  $36\pm 12$  ) , sin antecedentes de exposición laboral al plomo inorgánico, tabla IV.

#### 3.1.1.2 Obtención de muestras.

Las determinaciones de Testosterona, SHBG, LH y FSH, se realizan en suero de estos trabajadores.

Las determinaciones de Plomo y Cinc-Protoporfirina IX se realizan en sangre heparinizada recogida en tubos de plástico, lavados previamente en ácido nítrico al 10% y aclarados varias veces

**GRUPO CONTROL : 40 VARONES CON EDADES COMPRENDIDAS**

**ENTRE 20 Y 60 AÑOS**

**GRUPO EXPUESTO : 46 VARONES CON EDADES COMPRENDIDAS**

**ENTRE 21 Y 52 AÑOS**

<b>GRUPOS</b>	<b>DURACION DE LA EXPOSICION</b>	<b>N</b>	<b>EDAD</b>	<b>INTERVALO</b>
<b>GRUPO 1</b>	<b>&lt; 1 AÑO</b>	<b>10</b>	<b>30± 9</b>	<b>(21-44)</b>
<b>GRUPO 2</b>	<b>1-5 AÑOS</b>	<b>15</b>	<b>33±12</b>	<b>(21-46)</b>
<b>GRUPO 3</b>	<b>&gt; 5 AÑOS</b>	<b>21</b>	<b>34±10</b>	<b>(25-52)</b>

**Tabla nº IV**

con agua bidestilada.

Las muestras de sangre se obtienen por venopunción a primera hora de la mañana en tubos especiales de vidrio y plástico. Para la determinación de testosterona se realizan tres extracciones a intervalos de 20 minutos. Todas las muestras se congelan a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser procesadas. La metodología se describe en la tabla V.

### **3.1.2.Descripción del modelo experimental.**

Se realiza en ratones machos Balb C de nueve semanas, procedentes de IFFA-CREDO ( En Mayo de 1982 en la 152 generación ), se mantienen en el estabulario en condiciones estables de luz y temperatura (  $25^{\circ}\text{C}$  y 12 horas de luz ) .Para evitar los efectos de hacinamiento sobre este eje hormonal, se colocan 5 animales por caja. Las oscilaciones estacionales y circanuales de testosterona que afectan a estos animales, se corrigen por comparación con un grupo control que se sacrifica mensualmente y al mismo tiempo que los animales tratados.

#### **Duración del ensayo :**

Teniendo en cuenta que el promedio de vida de estos ratones es de aproximadamente dos años ( 711 días para los machos ), para obtener un diseño experimental equivalente al grupo de trabajadores expuestos ( de 1 a 20 años ), el ensayo se realiza a lo largo de un periodo de seis meses.

**METODOLOGIA EN POBLACION LABORAL EXPUESTA****PARAMETROS PARA LA VALORACION DE LA EXPOSICION AL PLOMO**

1.- Plomo en sangre : Espectrofotometría de absorción atómica

2.- Cinc-Protoporfirina eritrocitaria : Fluorimetría

**PARAMETROS PARA LA VALORACION DE LA FUNCION ENDOCRINA****DETERMINACIONES BASALES**

Testosterona : RIA ( Tras cromatografía en Celite )

S.B.G. : Índice de unión de DHT-H<sup>3</sup>

Índice de Testosterona libre : % de T / SBG

LH : RIA

FSH : RIA

Tabla nº V

#### Grupo expuesto:

Lo constituyen 30 ratones Balb C machos, escogidos al azar de un lote homogéneo inicial, que tras un período de adaptación de una semana al estabulario, inician el tratamiento con 366 mg/L de acetato de plomo en el agua de bebida, { 250 µg/ml de Pb X 4 ml/día ( valor promedio de agua de bebida ) = 1000 µg/día }. Con un peso inicial de 25 g, tabla VI.

#### Grupo control:

Lo constituyen 30 ratones Balb C machos, escogidos al azar por el mismo sistema que el grupo tratado, que tras un periodo de adaptación de una semana al estabulario , se les suministra como agua de bebida, agua destilada, tabla VI.

#### Obtención de muestras.

Mensualmente se procede a la extracción de sangre, testículos , cerebro , hueso ( Tibia y Peroné ), hígado, y riñones, tras anestesia con tiopental sódico y posterior sacrificio, de 5 ratones control y 5 ratones tratados.

Se procede al pesado de los animales, y, posteriormente, en una balanza con precisión en las décimas de milígramo , se determinan los pesos de los órganos anteriormente mencionados.

#### 3.1.2.1.Procedimiento analítico.

**MATERIAL EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION**

**GRUPO CONTROL : 30 RATONES BALB/C  
MACHOS A LOS QUE SE LES SUMINISTRA  
AGUA DESTILADA COMO AGUA  
DE BEBIDA**

**GRUPO TRATADO : 30 RATONES BALB/C  
MACHOS A LOS QUE SE LES SUMINISTRA  
ACETATO DE PLOMO EN EL AGUA DE LA  
BEBIDA.**

**366 mg/L ( aprox 1000  $\mu$ g/día/animal )**

**Tabla nº VI**



El tratamiento de los órganos para la determinación de Pb en tejidos se describe en 3.2.7. Para la realización de los ensayos hormonales, los testículos se homogenizan en un homogenizador Polytron con 4 ml de tampón fosfato 0,5 M para extracción de esteroides a pH 7.4. La duración de este proceso es de dos minutos, con intervalos de 15 segundos de reposo y conexión. Se separan cuatro alícuotas de 1ml en cuatro tubos y se añaden los patrones internos de Testosterona, Androstendiona 17OH-Progesterona y Progesterona marcadas con  $^3\text{H}$  a cada uno de los tubos.

La extracción se realiza con 2 ml eter dietílico recién abierta la botella, para evitar la formación de peróxidos, durante cuatro horas a  $37^\circ\text{C}$  y con agitación continuada. Se separan las dos fases por centrifugación y posterior congelación de la fase acuosa, decantando la fase orgánica y procediéndose a una nueva extracción con 2 ml de eter dietílico, separando de nuevo la fase orgánica por el mismo procedimiento. Se mezclan en una única alícuota los dos extractos orgánicos y se llevan a evaporación en corriente de nitrógeno a  $40^\circ\text{C}$ . En cada serie de extracciones se realiza un extracto blanco de 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada, procesándose igual que las muestras reales. A partir de estos extractos secos se procede a realizar determinaciones de Progesterona, 17OH-Progesterona, Androstendiona y Testosterona por medio de radioinmunoensayo, tras cromatografía en Celite para la determinación de testosterona y androstendiona, según metodología descrita en capítulo 3.5.3, tabla VII.



**METODOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION**

- 1.- Se sacrificarán mensualmente 5 ratones del grupo control y 5 ratones del grupo tratado con acetato de plomo.
- 2.- Se procede a la extracción de sangre, hígado, huesos, riñones, cerebro y testículos.
- 3.- Se determinan las concentraciones de Pb en los distintos tejidos.
- 4.- Se determina la actividad ALA-D y la concentración de ZPP intraeritrocitaria
- 5.- Se determinan las hormonas de la vía  $\Delta^4$  de la síntesis de esteroides en testículo.

PROGESTERONA , 17-HIDROXIPROGESTERONA,  
ANDROSTENDIONA Y TESTOSTERONA

Tabla nº VII

### 3.2. Espectrometría de Absorción Atómica.

#### 3.2.1. Plomo en sangre y tejidos.

Las determinaciones de plomo en sangre y tejidos se realizan mediante la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica con cámara de grafito.

#### 3.2.2. Fundamento.

Se basa en la propiedad de que los átomos en estado fundamental absorben luz a una longitud de onda específica. A medida que aumenta el número de átomos presentes en la muestra se produce un aumento de la luz absorbida, lo que permite determinar cuantitativamente la cantidad de analito; ello es posible gracias a la ley de Beer, en donde la absorbancia guarda una relación lineal con la concentración:

$A = a.b.c$  , donde:

A = Absorbancia

a = Coeficiente de absorptividad ( constante para cada elemento )

b = Anchura del paso de luz

c = Concentración

El uso de fuentes especiales de luz y la selección de la longitud de onda, permite la determinación cuantitativa y específica de elementos individuales en presencia de otros elementos, ( Pinta y col., 1980 ) y ( Ximenez, 1982 ).

### 3.2.3. Procedimiento analítico.

La cuantificación se lleva a cabo mediante el método de adición interna, ya que de este modo se corrige parcialmente la interferencia de matriz, muy importante cuando se trabaja con muestras biológicas, sangre o tejidos.

Los standards utilizados para la adición son de 25  $\mu\text{g/L}$  y 50  $\mu\text{g/L}$ , preparados ambos, a partir de una solución patrón de nitrato de plomo de 1000  $\mu\text{g/ml}$  ( Koch-Light Laboratories Ltd. ).

### 3.2.4. Corrección de fondo.

Una interferencia de tipo espectral, común en absorción atómica, que no puede ser compensada por el método de adiciones, es la absorción de fondo producida por moléculas concomitantes. Esta absorción se produce cuando formas moleculares no disociadas de la matriz tienen espectros de absorción que se superponen a la longitud de onda de absorción atómica del analito. Para corregir este tipo de interferencias, utilizamos una fuente de luz continua ( lámpara de deuterio ) que está conectada al sistema óptico, y que emite luz de un amplio espectro de longitudes ( 170 a 320 nm ). Con el empleo simultáneo de este corrector de fondo, conseguimos corregir la absorción no específica.

### 3.2.5. Cálculos.

El modo de integración utilizado es el área de pico, pues nos da una indicación directa de la cantidad de analito presente en la cámara de grafito. La cuantificación por área de pico está menos afectada por algunas interferencias que la cuantificación por altura de pico, aunque se debe tener gran cuidado en hacer coincidir exactamente el tiempo del ciclo de atomización con la lectura espectrofotométrica, y así mismo deben evitarse oscilaciones de la línea de base.

### 3.2.6. Programa de atomización.

La secuencia programada de temperatura y tiempo que utilizamos para calentar y atomizar ( pasar a su estado fundamental ) la muestra en el tubo de grafito, es la siguiente:

	Temperatura	Tiempo
Etapa 1 ( Secado )	80°C	10 seg
Etapa 2	120°C	20 seg
Etapa 3	250°C	10 seg
Etapa 4 ( Carbonización )	500°C	30 seg
Etapa 5 ( Atomización )	1800°C	5 seg
Etapa 6 ( Limpieza )	2000°C	5 seg
Etapa 7 ( Enfriamiento )	20°C	2 seg

El agua de refrigeración encargada de enfriar el tubo de grafito después de la atomización, fluye con un caudal de dos litros por minuto.

El Argón es el gas inerte utilizado como protector de la cámara de grafito, previniendo la destrucción de la misma a altas temperaturas.

El volumen de muestra inyectada es de 5  $\mu\text{L}$  y para cada determinación se realizan tres lecturas.

La fuente de luz requerida para el análisis es una lámpara de cátodo hueco de plomo, midiéndose la absorbancia que se produce a la longitud de onda de 283.30 nm, con una intensidad de corriente de 5 mA, necesaria para un rendimiento óptimo de la lámpara.

Trabajamos con el sistema de doble haz, ya que de este modo se mejora la estabilidad de la línea de base y las fluctuaciones en la intensidad de la fuente de luz no son interpretadas como fluctuaciones en las lecturas del Espectrofotómetro, ( Amore y col., 1974 ) y ( Brodie y col., 1977 ).

### 3.2.7. Preparación de las muestras de tejidos.

Para la digestión de los órganos se utilizan reactores a presión Phaxe 2005 con contenedores de teflón. Se pesan las muestras de órganos, se le añaden 3 ml de ácido nítrico concentrado Suprapur Merck ( ref 441) y se ponen en una estufa a 75  $^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas. Pasado este periodo de tiempo, se extrae el homogeneizado del órgano ya digerido y se enrasa hasta 10 ml con un matraz aforado de polipropileno. Esta solución final es la que se utiliza para la determinación de plomo en cada una de las muestras de tejido estudiadas; el resultado se expresa en  $\mu\text{g}$  de Pb/g de tejido.

### 3.2.8. Preparación de muestras de sangre.

Para la determinación de plomo en sangre se precipitan las proteínas de la muestra con ácido nítrico al 20 %, en la proporción 1/10 (V/V) ; los resultados se expresan en  $\mu\text{g/dL}$ .

Paralelamente y en cada lote de determinaciones se incluyen sangres control a tres niveles de concentración, suministradas por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo de Zaragoza

Todo el material utilizado es de polipropileno o poliestireno, con lo que se evitan los problemas de contaminación que aparecen cuando se trabaja con contenedores de vidrio, ( Brian y col., 1977 ) y ( Méranger y col., 1981 )

### 3.3. Determinación de Cinc-Protoporfirina IX.

A pesar de que son muchos los métodos propuestos para la determinación de la Cinc-Protoporfirina IX, marcador biológico de exposición laboral al plomo inorgánico, como cromatografía líquida de alta resolución, fluorimetría y espectroscopía de dicroísmo magnético circular, se ha seleccionado un método que permita una aplicación automatizada : el método fluorimétrico de dilución, ( Pérez de la Ossa , 1983 ).

En este método fluorimétrico deben realizarse en cada grupo o serie de determinaciones curvas de calibración de cinc-protoporfirina, ( Porphyrin Products. ).

#### 3.3.1. Realización de las curvas de calibración:

El estandar, grado analítico, de 1mg se disuelve con 1 ml de Proto-Solv ( Porphyrin Products ), y 10 ml de solución detergente ( Triton X-100 ) diluyéndose hasta obtener las siguientes concentraciones: 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/dL}$ , con una  $r= 0.995$ . Para compensar los efectos de matriz, se añaden 10  $\mu\text{l}$  de sangre completa con un contenido despreciable en ZPP, y se agita hasta su total homogenización. La fluorescencia de los patrones se leerá en las mismas condiciones que las correspondientes a las muestras.

#### 3.3.2. Preparación de las muestras:

Las muestras de sangre total extraídas con EDTA  $\text{K}_3$  o heparina



sódica, y conservadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se descongelan y se homogenizan de la siguiente forma: 10  $\mu\text{L}$  de sangre se diluyen con 5 ml de una solución detergente (triton X-100) al 0.5 %, en una solución tampón  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HNa}_2$  a pH 7.4, se agita hasta su completa disolución, controlando que desaparezca la turbidez. Posteriormente se mide la intensidad de fluorescencia de la solución diluida a 594 nm con excitación a 424 nm

### 3.3.3. Condiciones analíticas:

Espectrofluorímetro Hitachi 100-60, longitud de excitación 424 nm, longitud de emisión 594 nm.

### 3.3.4. Sensibilidad del método:

La sensibilidad del método es del orden de 5  $\mu\text{g}/\text{dL}$  en sangre completa. El intervalo de trabajo es lineal entre 10 y 250  $\mu\text{g}/\text{dL}$  de sangre, cuando se emplea un factor de dilución 1/500.

### 3.3.5 Cálculos:

La concentración de ZPP se calcula a partir de la siguiente fórmula.

$$\text{ZPP ( } \mu\text{g/dL )} = I_m/I_p \times C_p$$

donde:

$I_m$  = Intensidad de fluorescencia de la muestra corregida para la fluorescencia de fondo.

$I_p$  = Intensidad de fluorescencia del patrón corregido para la fluorescencia de fondo.

$C_p$  = Concentración del patrón (  $\mu\text{g/dL}$  )

### 3.4. Determinación de $\delta$ -Aminolevulinato deshidratasa.

La actividad  $\delta$ -aminolevulinato deshidratasa en sangre se cuantifica por medida espectrofotométrica del complejo coloreado que se forma al reaccionar el porfobilinógeno con el reactivo de Ehrlich, en unas condiciones establecidas de tiempo y temperatura, ( Kajimoto y col., 1983 y Kondo y col., 1984 )

La temperatura de trabajo es de 37 ° C y la longitud de onda, utilizada para efectuar esta medida espectrofotométrica del complejo coloreado, es de 553 nm.

#### 3.4.1. Reactivos.

Triton X-100

Acido  $\delta$ -aminolevulínico

Tampón fosfato.

Acido Tricloroacético.

p-Dimetilaminobenzaldehido } ——— [ Reactivo de  
Acido acético. } Ehrlich

#### 3.4.2. Preparación de la muestra.

La extracción se realiza por venopunción, recogiendo la sangre en tubos que contienen heparina sódica o EDTA,

Se incuban 100  $\mu$ L de la muestra con 900  $\mu$ L de substrato ( Acido  $\delta$ -aminolevulínico ) en presencia de 500 $\mu$ L de tampón fosfato. La incubación se efectúa en la oscuridad durante 60 minutos y a 37 ° C .

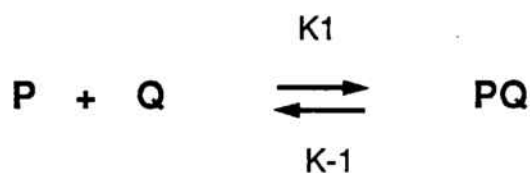
A continuación se añade ácido tricloroacético con la finalidad de precipitar las proteínas de la sangre y se centrifuga 5 minutos a 3000 rpm. Se recoge 1,5 ml del sobrenadante obtenido del incubado anterior, se añade reactivo de Ehrlich, que al reaccionar con el porfobilinógeno formado produce el complejo coloreado que nos indica la actividad de la enzima  $\delta$ -aminolevulinato deshidratasa en sangre.

#### 3.4.3. Cálculo.

Las unidades de actividad se expresan en U (ALA-D ) / ml eritrocitos = DO muestra ( 553 nm )/ Hematocrito % x 3226, e indican el n° de moles transformados por minuto y ml de eritrocitos.

### 3.5. Análisis competitivo.

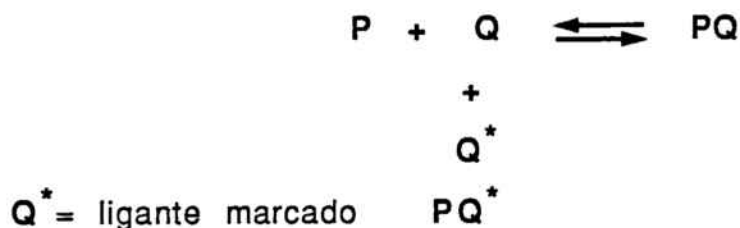
Entre los procedimientos analíticos basados en la unión no covalente entre dos reactantes, el análisis de unión por competición, o CPB, se funda en la reacción específica entre un ligando y una proteína de unión, y obedece a la ley de acción de masas.



Donde P es la proteína de unión, Q el ligante y PQ el complejo unido; K1 es la velocidad de formación del complejo y k-1 la velocidad de disociación.

La valoración cuantitativa se basa en la competición inhibitoria entre dos formas de una misma molécula para reaccionar con los locus de una segunda molécula, que se encuentra en concentraciones mas bajas. El término " análisis por saturación " utilizado por ciertos autores, se refiere a que uno de los reactantes está en menor proporción ( saturable ), para que la competición pueda tener lugar con una sensibilidad del método deseada.

En resumen, podemos decir que una substancia no marcada competirá con otra marcada por su unión específica a una proteína de unión.



Como resultado de esta competición, la proporción de fracción unida a la libre del ligando marcado, denominado como B/F , disminuye al aumentar la concentración del ligando no marcado. La concentración de una muestra desconocida puede obtenerse por comparación de la inhibición observada por ésta con la producida por una a concentraciones conocidas.

Tal tipo de ensayo puede subdividirse en :

1.- Inmunológico, cuando la proteína de unión es un anticuerpo específico del ligando o antígeno.

2.- Receptor análisis cuando la proteína es el receptor del órgano diana para la hormona o droga determinada.

3.- Permaneciendo las siglas CPB cuando la proteína de unión empleada es la de transporte plasmático de la sustancia a valorar, así la TBG para la tiroxina, transcortina para el cortisol y progesterona, etc.

Las características propias de cada una de estas proteínas viene resumida en el cuadro.

<u>PROPIEDADES</u>	<u>ANTICUERPO</u>	<u>RECEPTOR</u>	<u>PROT. DE TRANSPORTE</u>
Ka	Muy alta	$10^{-8} - 10^{-10}$ M	$10^{-7} - 10^{-9}$ M
Especificidad estructural	Alta	Alta	reacción cruzada con subst. relacionadas
Relación con activ. biológica	No existe	Muy alta	Alta
Estabilidad	Estable	Inestable	Estable
Preparación	Imunización	Fracc. celular	Dilución de suero

### 3.5.1. Radioinmunoensayo.

Las bases del Radioinmunoanálisis ( RIA ) son pues la inhibición competitiva entre una sustancia marcada isotópicamente y la misma no marcada, por su anticuerpo específico, de acuerdo con la ecuación generalizada de la figura y.

Donde, si denominamos F y B respectivamente a las concentraciones de sustancias marcada libre o unida al anticuerpo y T a la cantidad total de sustancia marcada del sistema,

$$T = F + B = Ag^* + Ag^*-Ac \quad Ag^* = \text{Antígeno marcado}$$

Cuando la concentración total de sustancia no marcada añadida aumenta ( Ag en la figura 16 ) el anticuerpo se unirá preferentemente con ella a expensas de una disminución de unión con la marcada. Gráficamente obtenemos : la relación de B con la concentración S del patrón o problema ( sustancia no marcada ).

Esta " curva standard " que refleja la relación dosis-respuesta puede construirse también relacionando S con B/T o B/ Bo, denominando Bo a la unión máxima del antígeno marcado con el anticuerpo ( Ag\*-Ac ), que se consigue cuando no hay presencia de S no marcada o con la fracción libre F.

#### 3.5.1.1. Requerimientos.

Los elementos reactantes básicos del RIA son : 1) antígeno en

**RADIOINMUNOENSAYO**

Denominamos **F** a la concentración de substancia  
marcada libre

Denominamos **B** a la concentración de substancia  
marcada unida al anticuerpo

Denominamos **T** a la cantidad total de substancia  
marcada del sistema

$$T = F + B = Ag^* + Ag^*Ac$$

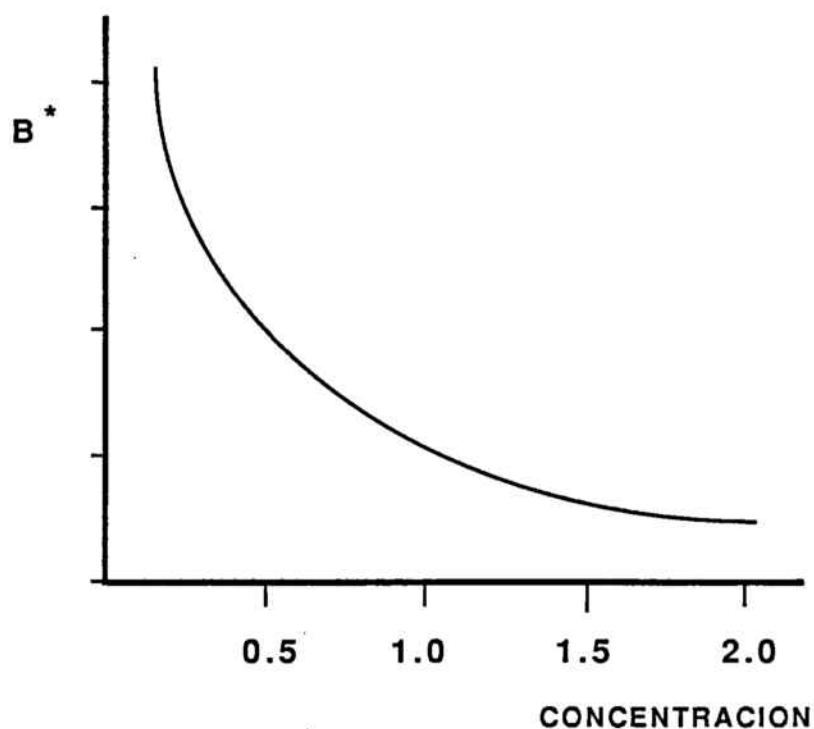


Figura nº 16



ambas formas, marcado y no marcado, 2) anticuerpo específico para este antígeno, 3) medio de separación de la fracción libre ( F ) y ligada, puesto que las bajas concentraciones de antígeno y anticuerpo usados en el RIA determina que el complejo Ag-Ac permanezca soluble al igual que los componentes libres.

#### 3.5.1.2. Antígenos marcados.

La LH, FSH, Cortisol y DHA-S, están marcados con  $^{125}\text{I}$ ; la lectura de la actividad de este isótopo se realiza en un contador gammá de centelleo sólido.

Testosterona, SBG, 17OH-Progesterona, Progesterona y Androstendiona están marcadas con  $^3\text{H}$  ; la lectura de la actividad de este isótopo se realiza mediante un contador beta de centelleo líquido.

#### 3.5.1.3. Métodos hormonales.

Preparación de las muestras de suero de los trabajadores expuestos:

##### 3.5.1.3.1. Testosterona:

Radioinmunoensayo, con extracción previa con éter dietílico y posterior separación en columna de Celite, ( Abraham, 1973 ), Bio-Merieux , se describe en 3.5.1.8.

Sensibilidad 5ng/dl.

#### 3.5.1.3.2. SBG ( Proteína transportadora de esteroides sexuales ):

Radioensayo que determina la capacidad de unión de la SBG por la dihidrotestosterona marcada con  $^3\text{H}$ , Serono.

#### 3.5.1.3.3. LH ( Hormona luteinizante ):

Radioinmunoensayo con antígeno marcado con  $^{125}\text{I}$ , Famos, con suero directo. El método de separación hormona libre-hormona ligada al anticuerpo se realiza con un doble anticuerpo ( anticuerpo antigammaglobulina + polietilenglicol ).

Sensibilidad 1 mUI/ml.

#### 3.5.1.3.4.FSH ( Hormona Folículo estimulante ):

Radioinmunoensayo con antígeno marcado con  $^{125}\text{I}$ , Famos, con suero directo. El método de separación es idéntico que el descrito para la LH.

Sensibilidad 1 mUI/ml.

#### 3.5.1.3.5. Cortisol:

Radioinmunoensayo con antígeno marcado con  $^{125}\text{I}$ , Radioassay Systems Laboratories ( R.S.L.), con suero directo. El anticuerpo se encuentra unido al tubo de plástico.

Sensibilidad 1 $\mu\text{g}$ /ml

#### 3.5.1.3.6. DHA-S ( Dehidroepiandrosterona-Sulfato ):

Radioinmunoensayo con antígeno marcado con  $^{125}\text{I}$ , Diagnostic Products Corporation ( D.P.C ). El anticuerpo se encuentra unido al tubo de plástico.

Sensibilidad 0.05  $\mu\text{g/ml}$ .

Preparación de las muestras de testículos de ratones antes de iniciar el radioinmunoanálisis ( RIA ).. de la vía  $\Delta 4$  de la síntesis de esteroides.

3.5.1.4. Vía  $\Delta 4$ : Progesterona, 17OH-Progesterona, Androstendiona y Testosterona. Homogenización, extracción y control de recuperación como se describe en 3.1.2.1.

#### 3.5.1.4.1. Progesterona:

Se resuspende el extracto seco con 0,5 ml de tampón albumina a pH 7,4 y se procede a la realización del radioinmunoanálisis según especificaciones del fabricante.

Antígeno marcado  $^3\text{H}$  Progesterona.

Solución precipitante de la fase libre, mediante adsorción con charcoal-dextrano.

Sensibilidad 0.1 ng/ml

#### 3.5.1.4.2. 17OH-Progesterona:

Disolver el extracto seco con 1 ml de tampón albúmina a pH 7,4 ,diluir al 1/10.

Proceder a la realización del radioinmunoanálisis según especificaciones del fabricante.

Antígeno marcado  $^3\text{H}$  17-OH Progesterona.

Solución precipitante de la fase libre : charcoal-dextrano.

Sensibilidad 0.1 ng/ml.

La Androstendiona y la Testosterona precisan una purificación cromatográfica previa al radioinmunoensayo.

#### 3.5.1.4.3. Cromatografía en columna.

Soporte : Celite. Fase estacionaria : etilenglicol. Fase móvil : Isooctano con concentraciones crecientes de acetato de etilo.

El extracto seco de la cuarta parte de una alícuota del homogenizado de testículo se resuspende con 1 ml de isooctano y se agita durante un minuto.

Preparación de la columna de Celite : se lava con 3 ml de isooctano.

Procedimiento separativo:

- 1.- Se pasa por la columna 1ml del extracto disuelto en isooctano
- 2.- Se recupera con 1 ml de isooctano el resto del residuo seco
- 3.- Se pasa este otro ml por la columna

4.- Se añaden 4 ml de isooctano ( en esta fase se recuperan los esteroides más apolares como la progesterona y otros ).

5.- Se pasan 6 ml de isooctano: acetato de etilo ( 94 : 6 ); en esta fase se recupera la Dihidrotestosterona, Androstendiona y otros.

6.- Se pasan 2 ml de isooctano : acetato de etilo ( 94 : 6 ).

7.- Se añaden 6 ml de isooctano : acetato de etilo ( 80 : 20 ); en esta fase se recupera **TESTOSTERONA**.

8.- Estos 6 ml de isooctano acetato de etilo ( 80 :20 ), se evaporan a sequedad.

9.- Se resuspende el extracto seco con 1.5 ml de tampón fosfato a pH 7.2.

10.- Para valorar la recuperación del patrón interno ( T <sup>3</sup>H ), añadido tras la homogenización del testículo, se separan dos alíquotas de 0.2 ml del punto 9 a viales de contaje para proceder a su cuantificación.

#### 3.5.1.4.4. Androstendiona:

Recoger la primera fracción de 6 ml de isooctano : acetato de etilo ( 94 : 6 ) punto nº 5 .

Evaporar a sequedad y resuspender con 1,5 ml de tampón pH 7.4.

Antígeno marcado <sup>3</sup>H Androstendiona.

Solución precipitante de la fase libre : charcoal-dextrano.

Sensibilidad 6 ng/dl.

#### 3.5.1.4.5. Testosterona:

Se recogen los 6 ml de isooctano : acetato de etilo ( 80 : 20 ) del punto 7 y se procede como en 8 y 9 de 3.5.1.6.

Proceder a la realización del radioinmunoanálisis, según especificaciones del fabricante, por triplicado.

Antígeno marcado  $^3\text{H}$  Testosterona.

Solución precipitante de la fase libre : charcoal-dextrano.

Sensibilidad 5 ng/dl.

#### 3.5.1.5. Preparación de viales de centelleo.

Se decanta el sobrenadante que contiene la hormona unida al anticuerpo al vial de contaje. Se añade líquido de centelleo ( Supersolve ).

#### 3.5.1.6. Contaje:

En contador de centelleo líquido por acumulación de 4000 c.p.m.

#### 3.5.1.7. Cálculo :

- Efectuar las medias de contaje de los triplicados o duplicados, , según el caso, de AT ( actividad total ), blancos, patrones y problemas ( muestras ).

- Transformar estas cuentas en % respecto al  $B_0$  ( patron concentración 0 , o unión máxima del antígeno marcado ).

- En un sistema de coordenadas, colocar en abscisas las concentraciones de los patrones, y en ordenadas el % de sus cpm con respecto al  $B_0$ .

- Sobre la gráfica obtenida, se extrapolan los % sobre  $B_0$  de los problemas.

- Corregir según recuperación y factor de dilución de la alícuota final de muestra utilizada, para expresar el resultado final.

- Habitualmente se utiliza un programa de cálculo, utilizando unidades Logit para el %  $B/B_0$  y logarítmicas para la concentración.

### 3.6. Análisis Estadístico.

1.- La comparación de medias mediante la t de student fué utilizada para estudiar :

a.- Si los parámetros observados en los diferentes grupos de trabajadores expuestos, presentaban diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo de trabajadores no expuestos, considerados como grupo control.

Para ello se realizó una comparación de medias para cada uno de los parámetros y en cada uno de los grupos, ( Grupo 1, tiempo de exposición inferior a un año ), ( Grupo 2, tiempo de exposición entre uno y cinco años ) y ( Grupo 3, tiempo de exposición superior a cinco años ), frente al grupo control.

b.- Si existe una tendencia decreciente de la función testicular entre los distintos grupos expuestos en función del tiempo y para cada uno de los parámetros observados.

c.- El efecto del plomo inorgánico sobre la síntesis de testosterona intratesticular en el diseño experimental ( ratones Balb/C ), se compararon mensualmente el grupo tratado con acetato de plomo ( N = 5 ), frente al grupo control tratado con agua destilada ( N = 5 ), y para cada uno de los precursores de la vía  $\Delta 4$  de la síntesis de esteroides.

2.- La prueba de la t de student fué escogida para la comparación de medias por las siguientes razones :

a.- Porque al menos uno de los grupos expuestos, así como los



distintos lotes de animales de experimentación comparados en los distintos estudios eran inferiores a 30 casos.

b.- Porque la distribución de los parámetros biológicos estudiados en población humana, así como en animales de experimentación siguen una distribución normal.

**4. RESULTADOS.**

#### **4.1. Metodológicos:**

##### **4.1.1. Control de calidad :**

###### **Plomo en sangre :**

Independientemente de los controles internos utilizados diariamente en cada ensayo, se realizó un control externo del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo de Zaragoza, obteniéndose valores que en ningún caso se desviaron más de un 5% respecto del valor diana ( valor obtenido de las medias de 23 laboratorios nacionales participantes ). Los resultados intraensayo e interensayo obtenidos de los controles internos se muestran en la tabla VIII.

###### **Cinc-Protoporfirina IX :**

Las determinaciones se realizaron paralelamente en nuestro laboratorio y en el del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo de Barcelona, no superando en ningún caso más del 5% de diferencia en valores absolutos y a lo largo de todo el ensayo.

###### **Parámetros hormonales :**

En cada grupo de determinaciones analíticas se incorporaba una muestra de suero de valor conocido, control interno, y una muestra de

**RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD DE  
PLOMO EN SANGRE**

<b>INTERENSAYO</b>				
	V. esperado $\bar{X}(X1-X2)$	V. obtenido $\bar{X} \pm 2ds$	CV %	Correlación r
NIVEL 1	43 ( 39-47 )	43.7 $\pm$ 3.3	3.78	98.3
NIVEL 2	78 ( 72-84 )	78.6 $\pm$ 5.2	3.39	99.2

<b>INTRAENSAYO</b>				
	V. esperado $\bar{X} (X1-X2)$	V.obtenido $\bar{X} \pm 2ds$	C V %	Correlación r
NIVEL 1	43 ( 39-47 )	42.8 $\pm$ 2.2	2.6	99.5
NIVEL 2	78 ( 72-84 )	77 $\pm$ 3.5	2.2	98.5

Tabla nº VIII

suero de valor desconocido, procedente de un control de calidad externo para Testosterona y Progesterona ( Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie e.V. Externe Qualitäts Kontrolle de Bonn, RFA. ). Los resultados de estos controles, y a lo largo de todo el ensayo, no se desviaron más de un 7 % en progesterona y de un 5 % en testosterona, respecto del valor diana.

Los rendimientos de las extracciones en suero humano, así como en testículo de rata, tras adición de estándares internos marcados con  $^3\text{H}$  , oscilaron entre un 82% y un 97 %, rendimientos que pueden considerarse como aceptables.

Los coeficientes de variación interensayo fueron:

Progesterona : de un 10 % para un valor medio de 2.3 ng/ml.

17 OH Progesterona : de un 4.6 % para un valor medio de 5.1 ng/ml.

Androstendiona : de un 12 % para un valor medio de 47 ng/dl.

Testosterona : de un 7.7 % para un valor medio de 492 ng/dl.

LH : de un 11 % para un valor medio de 10 mUI/ml.

FSH : de un 8.3 % para un valor medio de 5.5. mUI/ml.

Cortisol : de un 6.5 para un valor medio de 9.7  $\mu\text{g}/\text{dl}$ .

DHA-S : de un 7.3 % para un valor medio de 2.5  $\mu\text{g}/\text{dl}$ .

#### **4.2.En población laboral expuesta:**

Los diferentes grupos de trabajadores y controles , sus edades y la duración de la exposición al plomo, se muestran en 3.1.1.1, tabla IX.

##### **4.2.1. Marcadores biológicos de exposición laboral.**

Las concentraciones de plomo y ZPP en sangre, así como los resultados de los diferentes parámetros endocrinológicos estudiados, se muestran en la tabla IX . Las concentraciones de plomo y ZPP en sangre fueron significativamente altas en todos los grupos de población laboral expuesta, respecto del grupo control, figura 17 , pero no se detectan diferencias entre los distintos grupos de población expuesta ( grupos 1,2,3 ). La desviaciones estándar del grupo 3 de trabajadores ( >5 años de exposición ) fueron menores que las de los otros dos grupos.

#### 4.2.2. Parámetros suprarrenales.

Los resultados de Cortisol y Dehidroepiandrosterona sulfato de los grupos expuestos no manifiestan diferencias significativas respecto del grupo control (  $p > 0.25$  ), figura 18 .

#### 4.2.3. Parámetros del eje hipotálamo-hipófiso-testicular.

Observamos que los niveles de testosterona en suero son significativamente inferiores (  $p \leq 0.01$  ) en el grupo 3 ( > a 5 años de exposición ), la SBG es significativamente elevada (  $p \leq 0.025$  ) , y el índice de testosterona libre ( T/SBG ) es aún mas claramente significativo (  $P \leq 0.001$  ), respecto del grupo control. En el grupo 2 ( de 1 a 5 años de exposición ) hay una disminución significativa del índice de testosterona libre (  $p \leq 0.05$  ), pero no existen diferencias significativas en las concentraciones de testosterona y SBG en

<b>GRUPOS</b> ( Media $\pm$ DS )	<b>Pb</b> $\mu\text{g/dL}$	<b>ZPP</b> $\mu\text{g/dL}$	<b>T</b> $\text{nmol/L}$	<b>SBG</b> $\text{nmol/L}$	<b>ITL</b> %	<b>LH</b> $\text{mU/ml}$	<b>FSH</b> $\text{mU/ml}$
<b>CONTROL</b>	17 $\pm$ 13	19 $\pm$ 12	22.9 $\pm$ 7.6	25 $\pm$ 6.7	93 $\pm$ 25	6 $\pm$ 3	5 $\pm$ 3
<b>GRUPO 1</b>	66 $\pm$ 22	257 $\pm$ 73	24.9 $\pm$ 6.7	26.4 $\pm$ 10	96 $\pm$ 30	10 $\pm$ 1.8	4.1 $\pm$ 1.5
<b>GRUPO 2</b>	73 $\pm$ 24	180 $\pm$ 190	23.2 $\pm$ 8	33.6 $\pm$ 11	71 $\pm$ 23	9.7 $\pm$ 1.4	4.5 $\pm$ 1.6
<b>GRUPO 3</b>	76 $\pm$ 11	374 $\pm$ 112	18.6 $\pm$ 4.6	34 $\pm$ 10.2	55 $\pm$ 15	10.7 $\pm$ 1.6	5.7 $\pm$ 2.5

Tabla nº IX

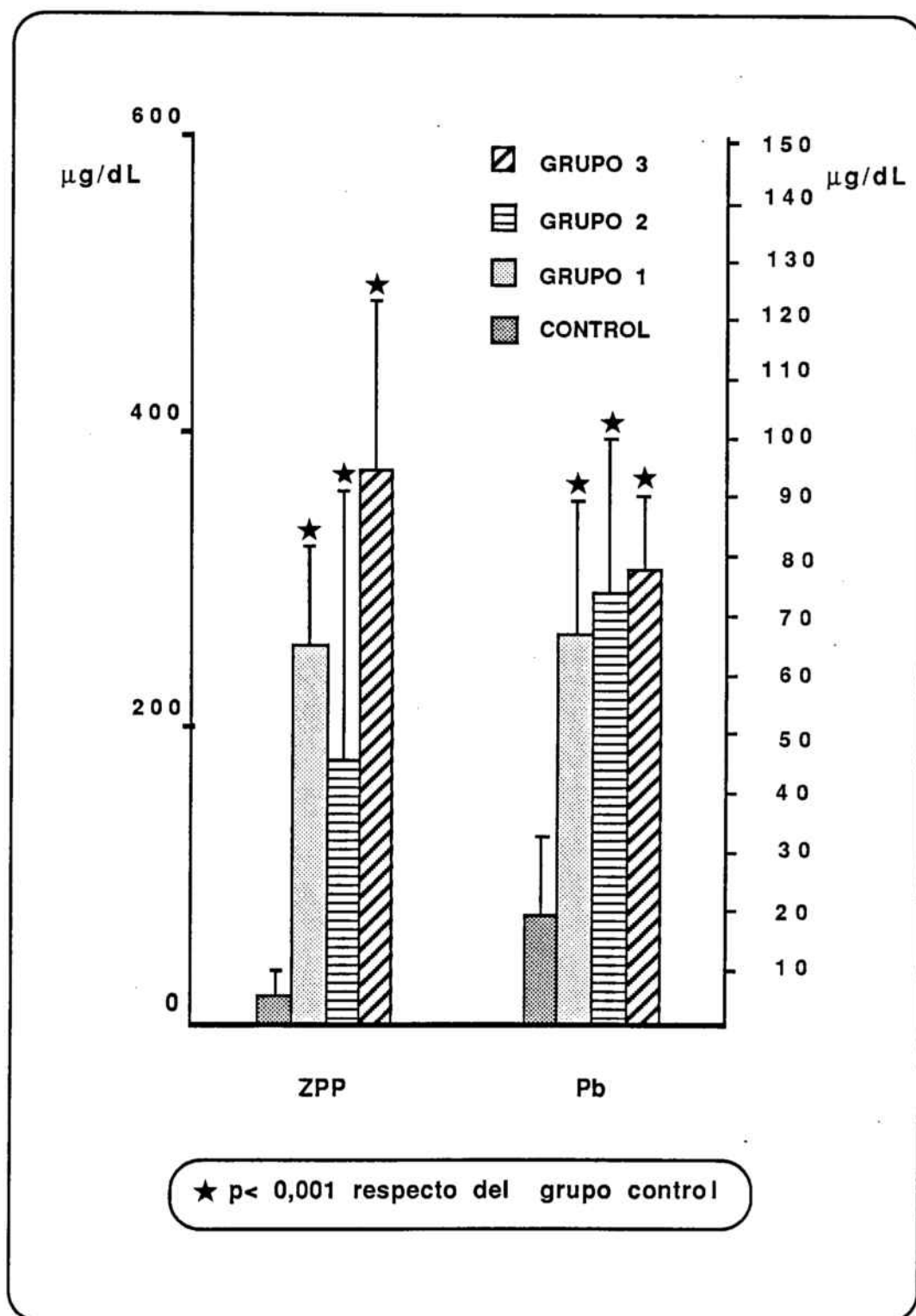


Figura nº 17



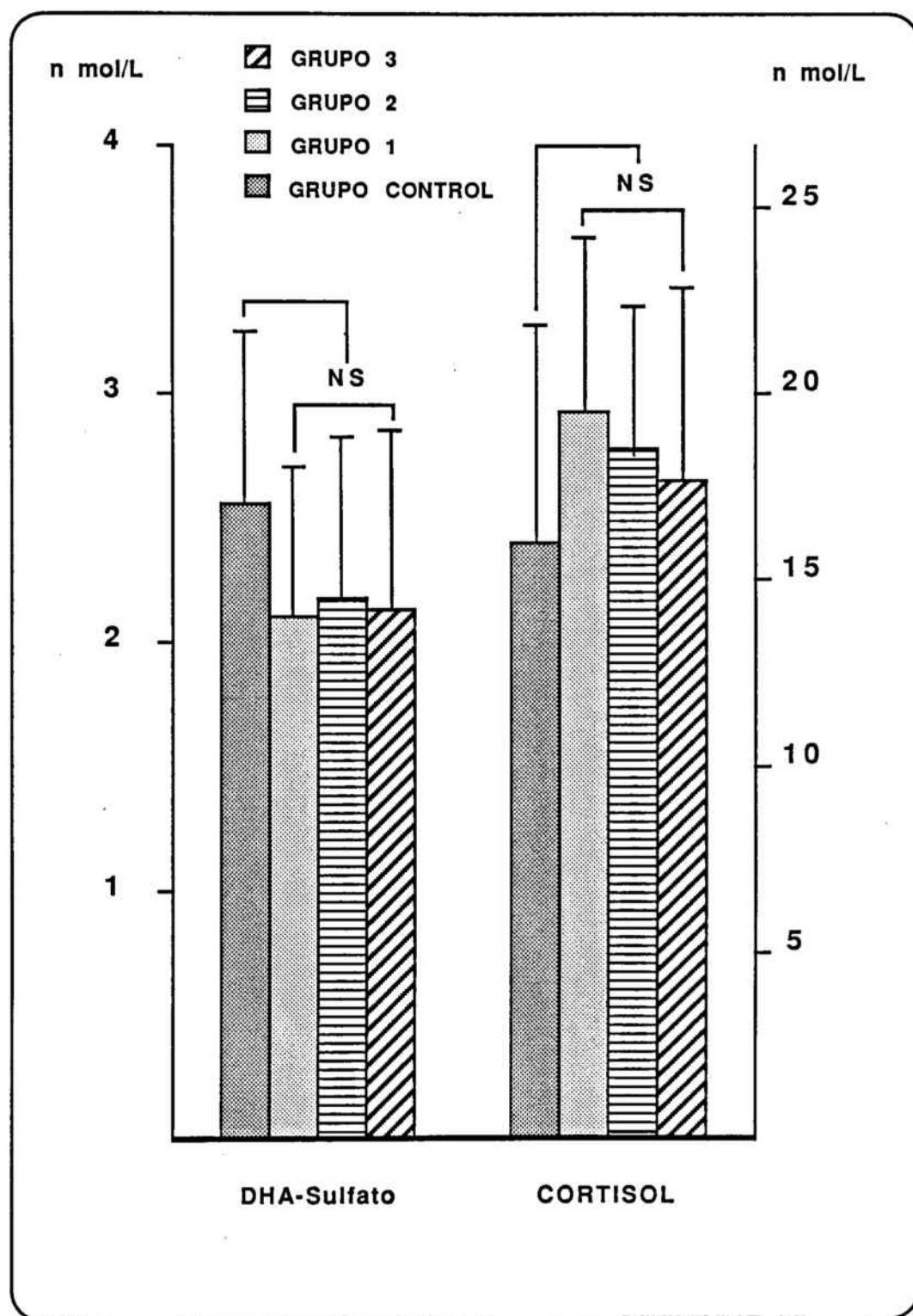


Figura nº 18

comparación con el grupo control ( figura 19 ). Los trabajadores del grupo 1 ( <1 año de exposición ) no presentan alteraciones significativas de sus parámetros endocrinos, a pesar de las cifras elevadas de plomo y ZPP.

La LH sérica se muestra significativamente elevada (  $p \leq 0.001$  ) en los trabajadores del grupo 1 ( < a 1 año de exposición ) respecto del grupo control, pero no se observan aumentos significativos de esta hormona respecto de los otros grupos de trabajadores con mayor tiempo de exposición , figura 20 .

Los valores de FSH no presentan alteraciones significativas en ninguno de los grupos de exposición, respecto del grupo control.

Se observa que no existe una clara correlación entre las concentraciones de plomo y ZPP y los valores de los diferentes parámetros endocrinológicos , solo en el grupo de mayor tiempo de exposición se insinúa una tímida correlación (  $r = 0.64$ ,  $p \leq 0.05$  ) de la testosterona, respecto a la ZPP.

#### **4.3. En animales de experimentación.**

Los resultados obtenidos en ratones Balb/C machos se desglosan en dos bloques; en el primero de ellos se exponen los resultados de: pesos corporales y de testículos, plomo en sangre y distintos tejidos ( testículo, riñón, hígado , cerebro y hueso ) y ZPP y ALA -D en sangre. En el segundo, se exponen los resultados obtenidos de la vía  $\Delta 4$  de la síntesis de esteroides ( progesterona, 17 $\alpha$ H-progesterona, androstendiona y testosterona ) intratesticulares.

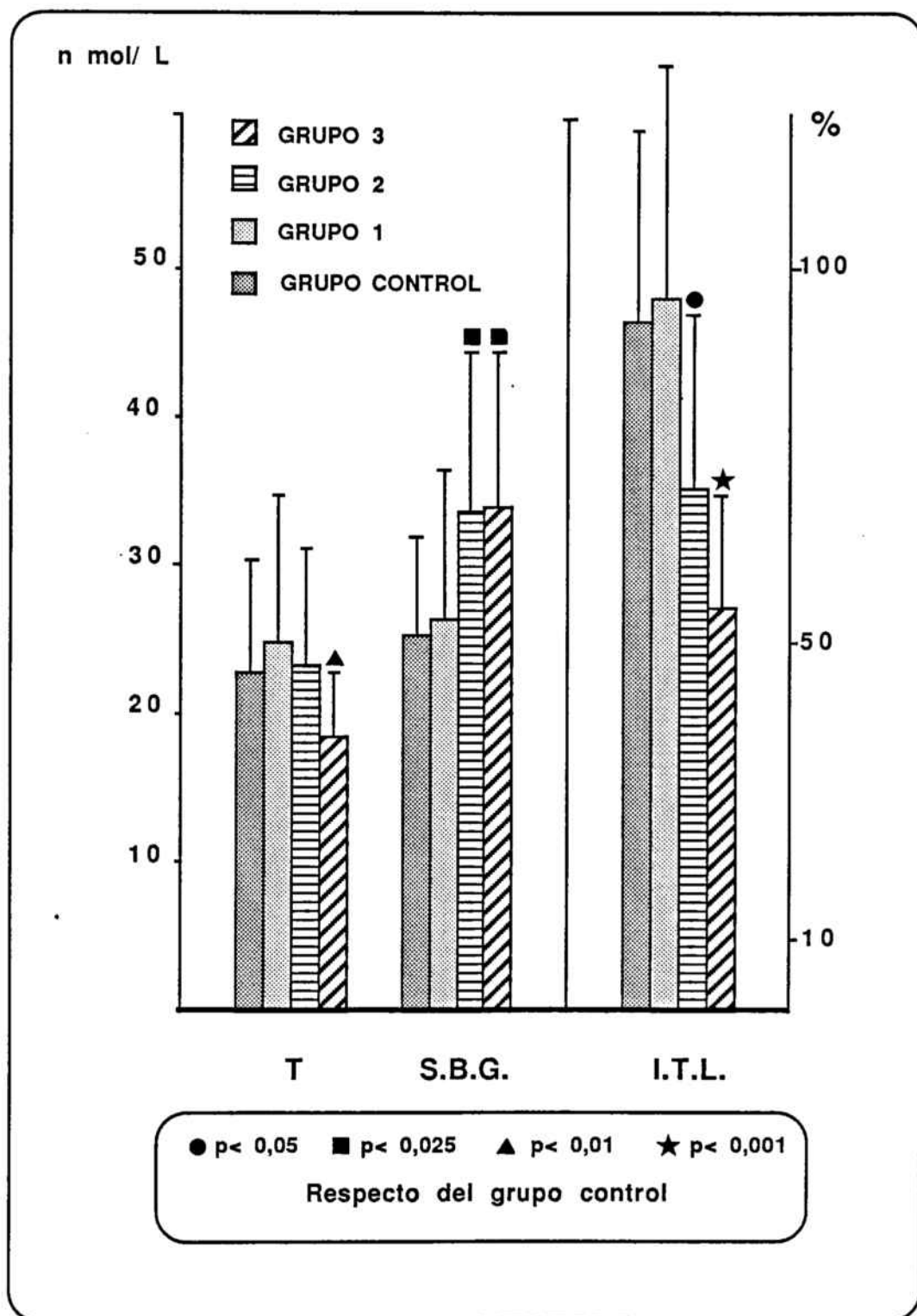


Figura nº 19

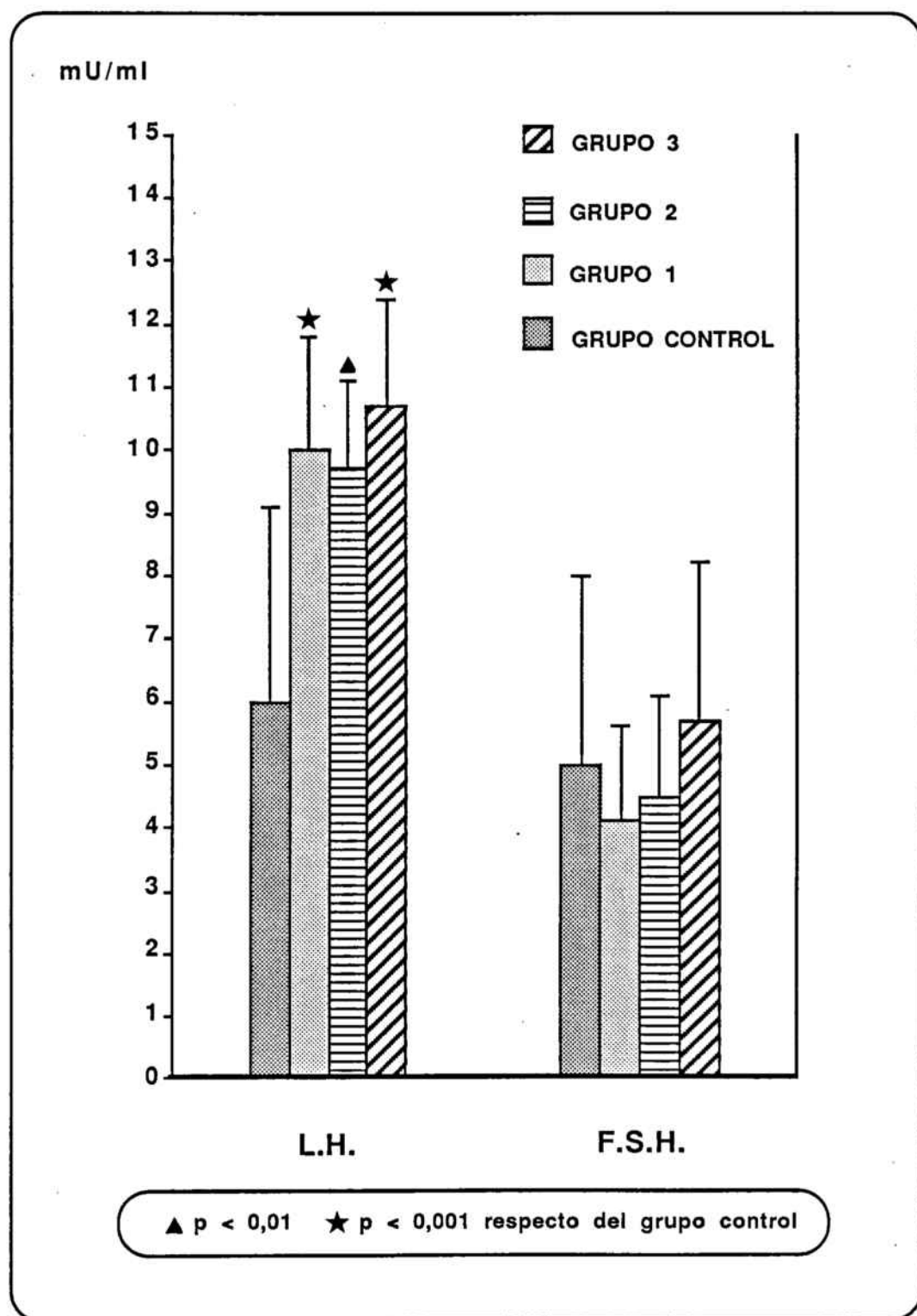


Figura nº 20

#### 4.3.1. Pesos corporales y testiculares.

Los pesos corporales antes del inicio del ensayo eran de  $22.4 \pm 1.4$  g. A los 30 días del inicio del ensayo, los pesos de los ratones tratados no son significativamente distintos de los del grupo control (  $27.1 \pm 0.2$  g v.s.  $25.0 \pm 0.1$  g ), y durante el resto del ensayo ( 60-180 días ), no se producen diferencias significativas entre los dos grupos, tabla X.

A nivel testicular sólo se observa una disminución significativa (  $p \leq 0.025$  ) del peso testicular del grupo tratado respecto del grupo control a los 60 días del inicio del ensayo, dejando de ser significativa a partir de los 90 días, (  $p > 0.25$  )

#### 4.3.2. Plomo en sangre:

Los resultados de plomo en sangre tras exposición a 366 mg/l de acetato de plomo en agua de bebida se muestran en la tabla XII y figura 21. Se observa que se mantienen constantes dentro de un rango de valores (  $X \pm ds$   $48.2 \pm 0.25$   $\mu\text{g/dl}$  a  $67.3 \pm 5.9$   $\mu\text{g/dl}$  ), y siempre significativamente superiores (  $p \leq 0.001$  a  $p \leq 0.0001$  ) respecto del grupo control (  $X \pm ds$   $5.2 \pm 0.141$   $\mu\text{g/dl}$  a  $7.3 \pm 0.1$   $\mu\text{g/dl}$  ) y a lo largo de los seis meses del ensayo.

#### 4.3.3. Plomo en tejidos:

Los resultados de plomo en distintos órganos se muestran en la tabla XI ). Se observa un diferente comportamiento de estos tejidos; así, en testículo, se produce un aumento de la concentración ,

días	grupo	PESO CORPORAL	PESO TESTICULAR
30	CONTROL	25.0 ± 0.1	0.123 ± 0.010
	TRATADOS	27.1 ± 0.2	0.125 ± 0.007
60	CONTROL	31.3 ± 1.9	0.142 ± 0.007
	TRATADOS	31.1 ± 1.2	0.119 ± 0.005
90	CONTROL	33.6 ± 2.8	0.124 ± 0.023
	TRATADOS	34.3 ± 0.3	0.143 ± 0.007
120	CONTROL	34.3 ± 2.8	0.140 ± 0.019
	TRATADOS	33.8 ± 1.9	0.129 ± 0.007
150	CONTROL	30.1 ± 0.2	0.140 ± 0.001
	TRATADOS	28.8 ± 2.5	0.133 ± 0.011
180	CONTROL	34.0 ± 2.0	0.140 ± 0.010
	TRATADOS	36.0 ± 0.6	0.150 ± 0.058

**MEDIAS ± 1 DS en gramos**

**Tabla nº X**

días	grupo	CEREBRO	RIÑÓN	HIGADO	HUESO
30	CONTROL	0.13 ± 0.04	0.14 ± 0.05	0.19 ± 0.01	0.62 ± 0.08
	TRATADOS	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.04	1.43 ± 0.02	5.3 ± 0.2
60	CONTROL	0.30 ± 0.05	0.13 ± 0.04	0.33 ± 0.1	0.57 ± 0.07
	TRATADOS	0.31 ± 0.07	1.14 ± 0.24	6.3 ± 0.8	13.4 ± 1.9
90	CONTROL	0.28 ± 0.08	0.24 ± 0.11	0.20 ± 0.04	0.64 ± 0.07
	TRATADOS	0.29 ± 0.09	2.5 ± 0.3	8.8 ± 0.8	28.0 ± 6.5
120	CONTROL	0.23 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.85 ± 0.07
	TRATADOS	0.51 ± 0.14	3.8 ± 0.1	9.9 ± 0.4	40.9 ± 6.7
150	CONTROL	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.28 ± 0.14	0.72 ± 0.06
	TRATADOS	0.44 ± 0.05	4.4 ± 0.3	10.8 ± 0.5	46.3 ± 4.9
180	CONTROL	0.29 ± 0.03	0.26 ± 0.07	0.27 ± 0.07	0.65 ± 0.07
	TRATADOS	0.45 ± 0.05	5.5 ± 0.4	12.3 ± 0.34	48.6 ± 4.0

**MEDIAS ± 1 DS en µg/g de Pb en tejidos**

**Tabla nº XI**

**MARCADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSICIÓN LABORAL**

días	grupo	PLOMO	ZPP	ALA-D
30	CONTROL	5.0 ± 0.1	22 ± 3	21.5 ± 3.1
	TRATADOS	61.6 ± 4.7	25.2 ± 3.1	5.9 ± 3.9
60	CONTROL	5.0 ± 0.2	27.2 ± 4.3	21.4 ± 2.7
	TRATADOS	56.9 ± 2.7	27.9 ± 4.4	9.2 ± 2.2
90	CONTROL	4.9 ± 0.3	28.5 ± 3.6	19 ± 2.6
	TRATADOS	67.3 ± 5.9	30.2 ± 2.5	8.6 ± 1.9
120	CONTROL	5.9 ± 0.5	24.6 ± 2.3	22 ± 3
	TRATADOS	58.4 ± 2.9	28.1 ± 5.1	7.7 ± 0.9
150	CONTROL	6.5 ± 0.5	30.5 ± 6	20.5 ± 2.4
	TRATADOS	48.2 ± 0.25	37 ± 4	7.5 ± 2.4
180	CONTROL	4.5 ± 0.8	28.5 ± 3.5	21.4 ± 3.2
	TRATADOS	60.0 ± 1.5	34 ± 2	6.8 ± 1.7

**MEDIAS ± 1 DS      μg/dL      μg/dL      U/L**

**Tabla nº XII**



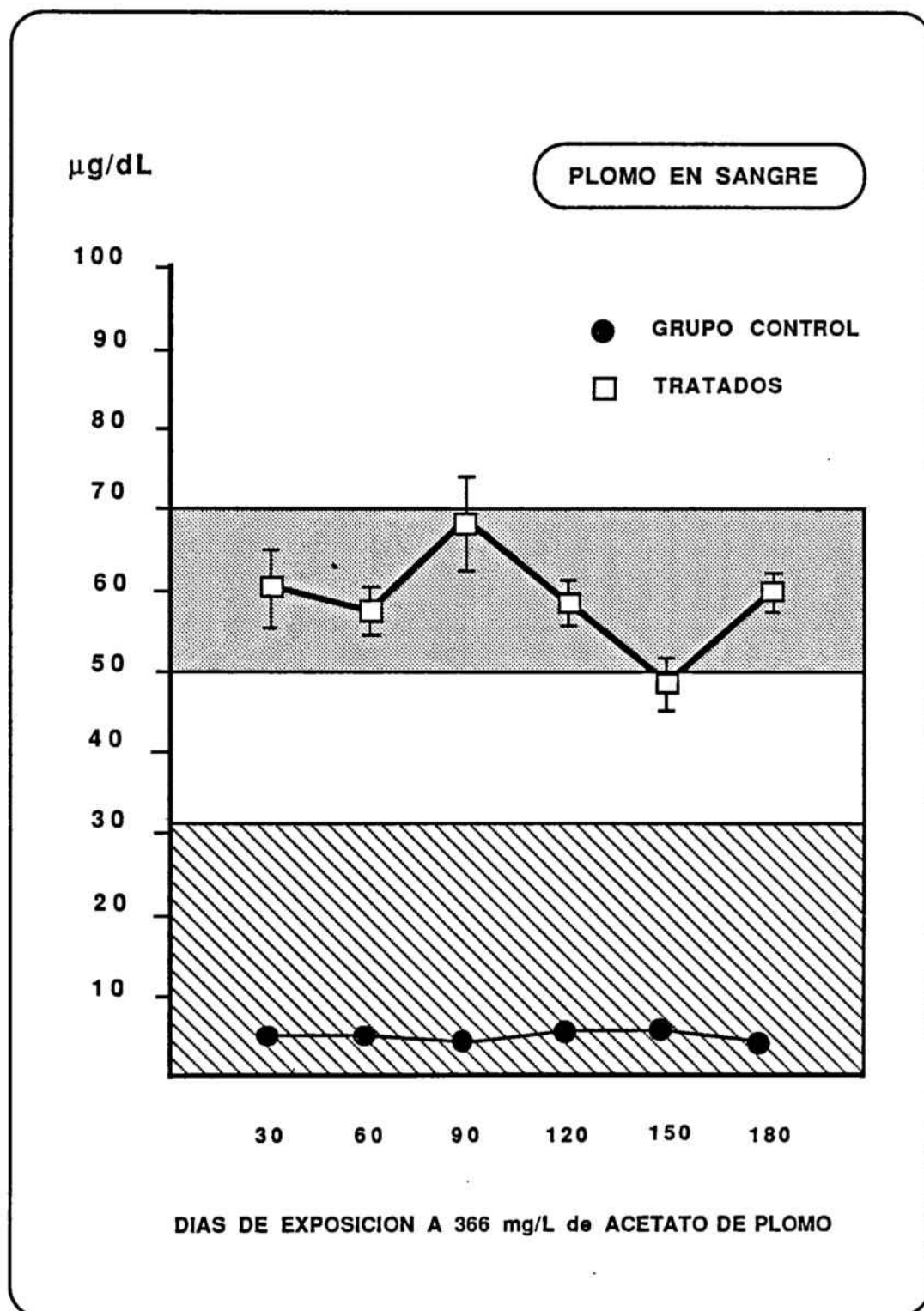


Figura nº 21

duplicándose a los 60 días y manteniéndose a lo largo del ensayo constante y significativamente elevada respecto del grupo control (  $p < 0.05$  a  $p < 0.001$  ); mientras que en los demás tejidos se produce una acumulación progresiva a lo largo de los seis meses del ensayo, lográndose alcanzar, en algunos casos, niveles varias veces superiores a los del grupo control, destacando las altas concentraciones obtenidas en hueso, más de 100 veces superiores a los valores control.

#### 4.3.3.1. Plomo en riñón.

En el grupo control los valores de Pb/g de tejido oscilan entre los  $0.14 \pm 0.05 \mu\text{g/g}$  a los 30 días, y los  $0.26 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$  al final del ensayo ( 180 días ). En el grupo tratado los valores de Pb/g de tejido se incrementan de  $0.29 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$  a los 30 días, a los  $5.5 \pm 0.4 \mu\text{g/g}$  de los 180 días, tabla XI y figura 22.

Las diferencias entre el grupo tratado y el control empiezan a ser significativas (  $p \leq 0.001$  ), a partir de los 30 días, para alcanzar una significación de  $p \leq 0.0001$  a partir de los 60 días, manteniéndose y aumentando estas diferencias y significación a lo largo del ensayo.

#### 4.3.3.2. Plomo en hígado.

En el grupo control los valores de Pb/g de tejido oscilan entre los  $0.19 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$  a los 30 días, y los  $0.29 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$  al cuarto mes del ensayo ( 120 días ). En el grupo tratado los valores de Pb/g de tejido se incrementan de  $1.43 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$  a los 30 días, a los  $12.3 \pm 0.34 \mu\text{g/g}$  de los 180 días tabla XI y figura 23.

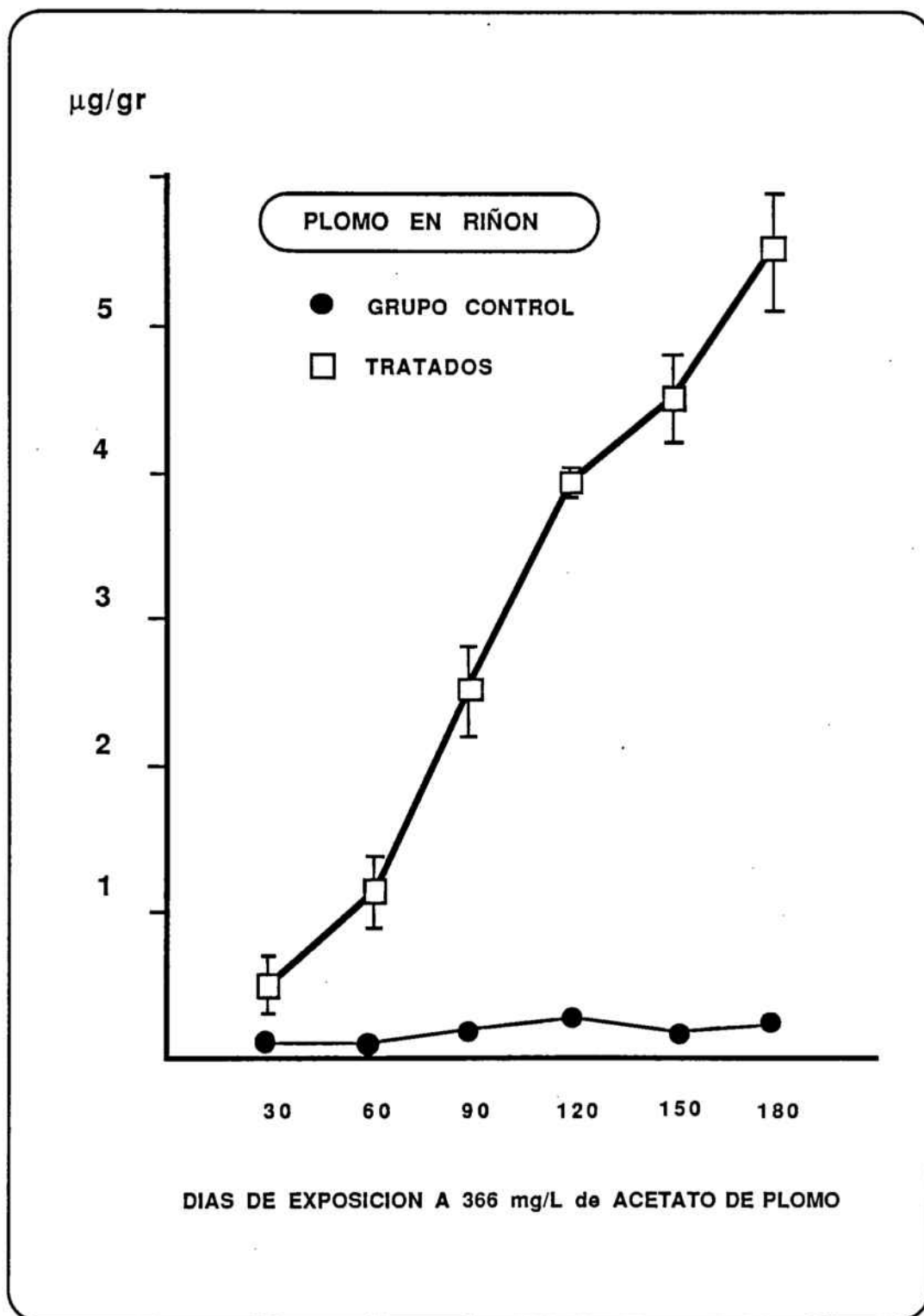


Figura nº 22

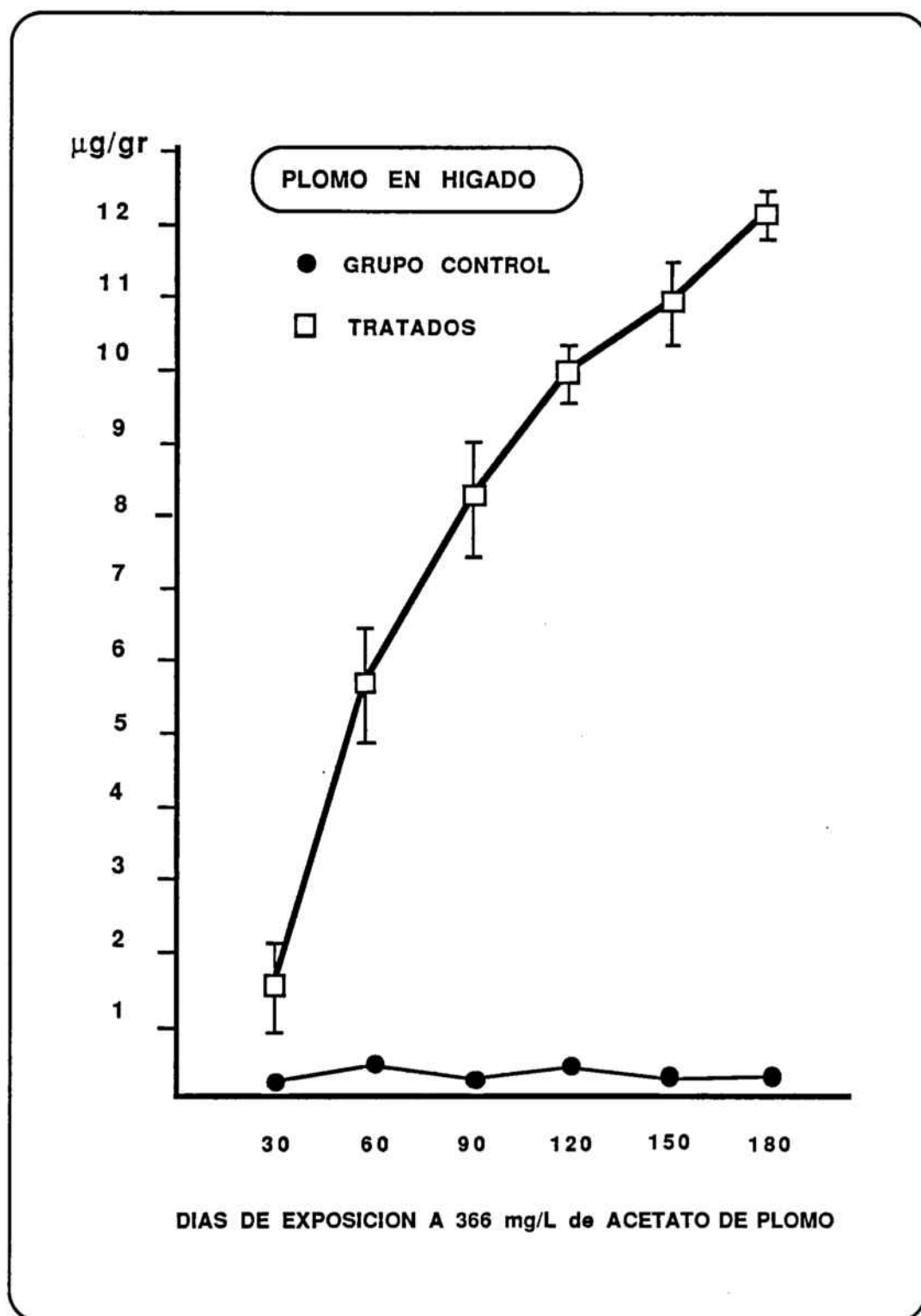


Figura nº 23

Las diferencias entre el grupo tratado y control empiezan a ser significativas (  $p \leq 0.001$  ) a partir de los 30 días, para alcanzar una significación de  $p \leq 0.0001$  a partir de los 60 días, manteniéndose los valores de las  $p$  y aumentando estas diferencias a lo largo del ensayo.

#### 4.3.3.3. Plomo en hueso ( tibia + peroné )

En el grupo control los valores de Pb/g de tejido oscilan entre los  $0.62 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$  a los 30 días, y los  $0.85 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$  al cuarto mes del ensayo ( 120 días ). En el grupo tratado los valores de Pb/g de tejido se incrementan de  $5.3 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$  a los 30 días, a los  $48.6 \pm 4.0 \mu\text{g/g}$  de los 180 días, tabla XI y figura 24.

Las diferencias entre el grupo tratado y control empiezan a ser significativas (  $p \leq 0.001$  ) a partir de los 30 días, para alcanzar una significación de (  $p \leq 0.0001$  ) a partir de los 60 días, manteniéndose y aumentando estas diferencias a lo largo del ensayo.

#### 4.3.3.4. Plomo en cerebro.

Los valores de plomo en cerebro en el grupo tratado, son significativamente superiores a partir de los 30 días, (  $p \leq 0.05$  ) respecto del grupo control, produciéndose una pérdida de esta significación en el segundo y tercer mes ( 60 y 90 días ). A partir del cuarto mes las diferencias vuelven a hacerse significativas (  $p \leq 0.05$  ).

Los valores del grupo control oscilan entre  $0.13 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$  del primer mes a  $0.29 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$  del sexto mes. Los valores del grupo

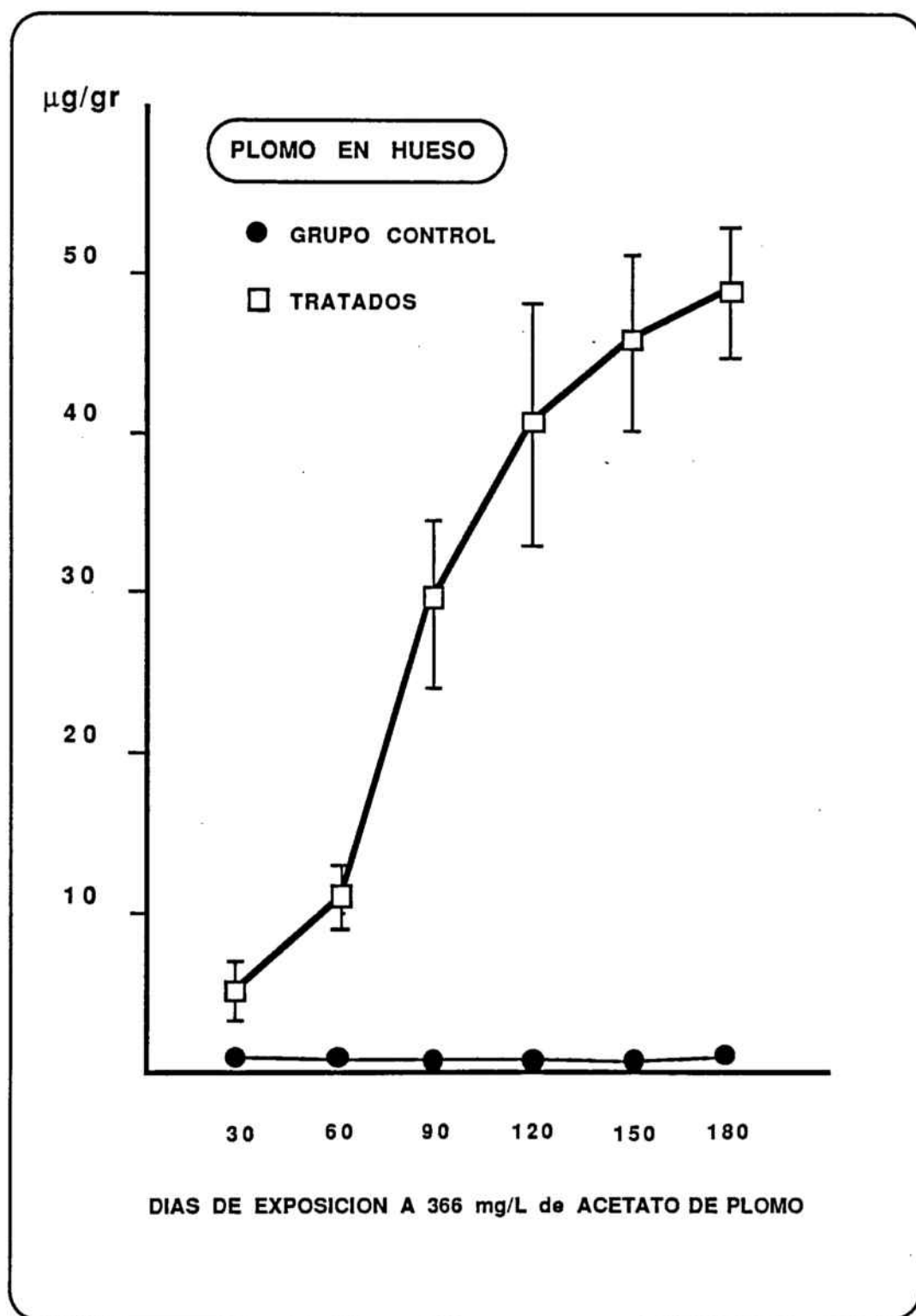


Figura nº 24

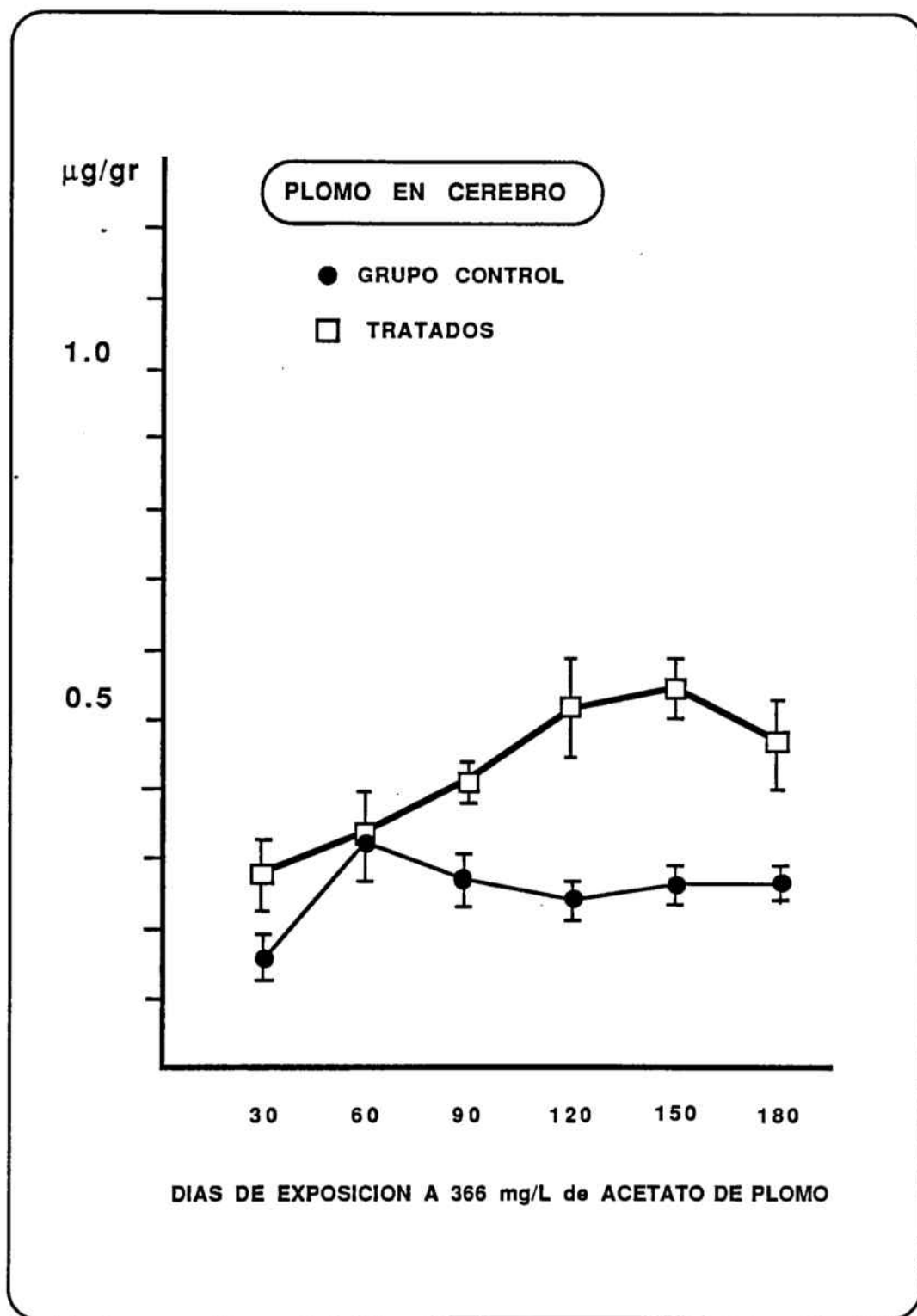


Figura nº 25

tratado oscilan entre los  $0.28 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$  del primer mes, a  $0.51 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$  del cuarto mes. Los valores obtenidos en cerebro se mantienen por debajo de los valores en sangre, tabla XI y figura 25.

#### 4.3.3.5. Plomo en testículos.

Las diferencias de Pb en tejido testicular, entre los ratones tratados y los controles, empiezan a ser significativas a partir de los 60 días ( $p \leq 0.05$ ); esta diferencia se mantiene significativa a lo largo del ensayo ( $p \leq 0.005$  a los 90 días,  $p \leq 0.0001$  a los 120 días,  $p \leq 0.005$  a los 150 días y  $p \leq 0.01$  a los 180 días), tabla XI y figura 26.

El comportamiento del Pb en testículos es, generalmente distinto al de otros compartimentos tisulares; aumenta a partir de los 60 días y se mantiene significativamente aumentado, sin sobrepasar  $1 \mu\text{g/g}$  en este tejido, pero siempre dentro de un rango de valores ( $0.6$  a  $0.9 \mu\text{g/g}$ ). El comportamiento es similar al hallado en sangre ( $0.48 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$  a  $0.67 \pm 0.06 \mu\text{g/g}$  frente a  $48.2 \pm 0.25 \mu\text{g/dl}$  a  $67.3 \pm 5.9 \mu\text{g/dl}$  del tejido testicular.

#### 4.3.4. Marcadores biológicos de exposición al plomo:

Los valores de ZPP y ALA-D se exponen en la tabla XII, observándose una clara y significativa disminución de la ALA-D del grupo tratado frente al grupo control ( $p \leq 0.001$ ) a lo largo de los seis meses del ensayo. No sucede lo mismo con la ZPP, que a lo largo del ensayo no sufre variaciones significativas frente al grupo control ( $p \leq 0.25$ )



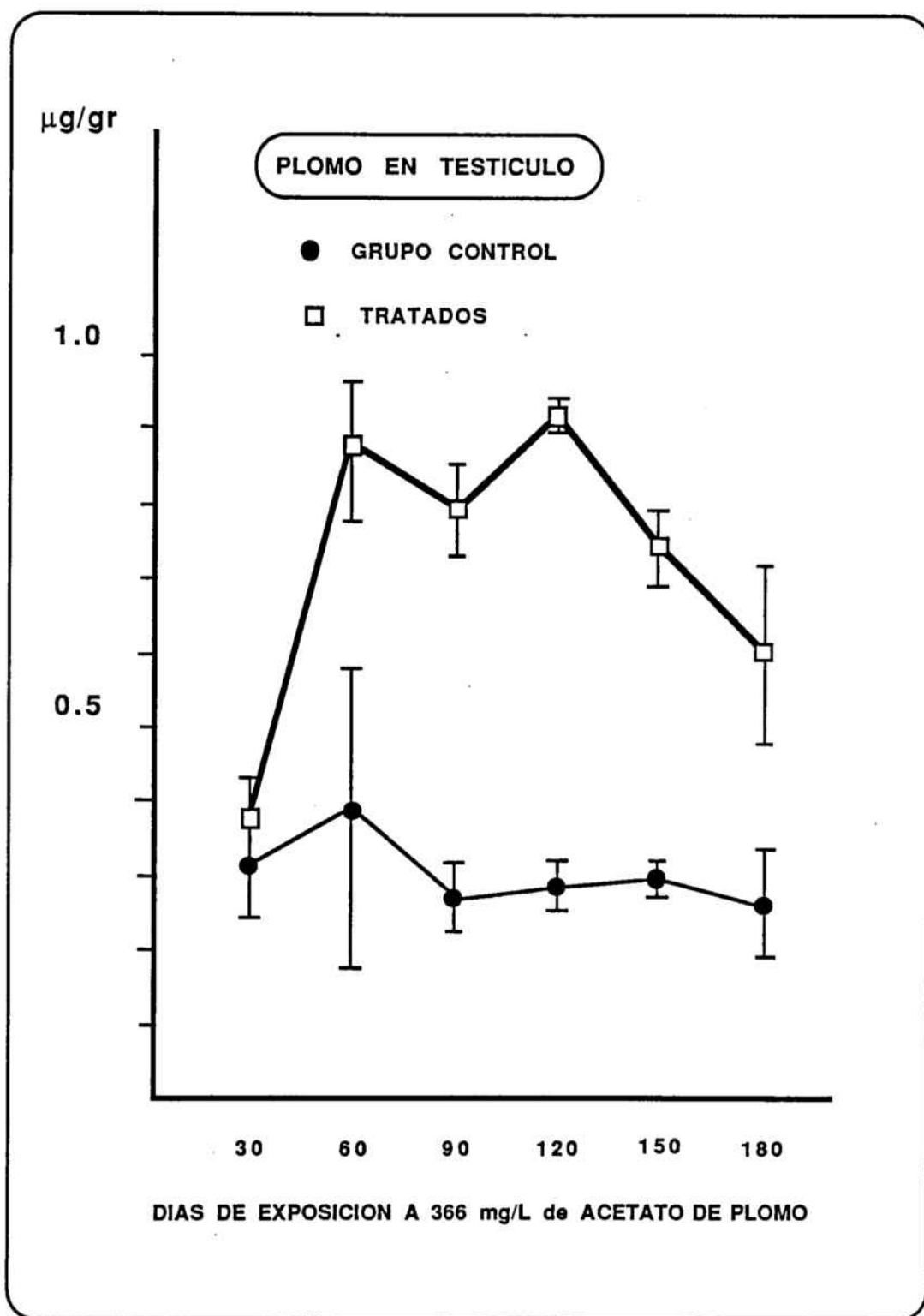


Figura nº 26

#### 4.3.5. Parámetros hormonales de la vía $\Delta 4$ de la síntesis de esteroides en tejido testicular.

##### 4.3.5.1. Progesterona:

Los valores de este precursor de la vía  $\Delta 4$  se muestran en la tabla XIII y figura 27, observamos fluctuaciones a lo largo del ensayo, que oscilan entre los 4 y los 40 pg/mg de tejido y afectan tanto al grupo control, como al grupo tratado, no observándose diferencias significativas entre estos dos grupos y a lo largo del ensayo (  $p \leq 0.25$ ).

##### 4.3.5.2. 17OH-Progesterona:

También se manifiestan, en los valores de esta hormona, oscilaciones a lo largo del ensayo, similares a las de la progesterona, pero de menor cuantía, oscilando, entre los 2 y los 20 pg/mg de tejido. No se observan diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado a lo largo de los 6 meses, tabla XIII y figura 28.

##### 4.3.5.3. Androstendiona:

La Androstendiona sufre oscilaciones a lo largo del ensayo, entre los 10 y los 60 pg/mg de tejido. Se observa una tendencia a disminuir los valores de concentración intratesticular en las ratas tratadas, tendencia que se hace significativa únicamente en el 5º mes (  $p \leq 0.05$  ), tabla XIII y figura 29.

dias	grupo	TESTOSTERONA	ANDROSTENDIONA	17 OH PROGEST	PROGESTERONA
30	CONTROL	129 ± 30	34 ± 8	9.8 ± 0.8	21.8 ± 1.9
	TRATADOS	49 ± 10	37 ± 8	9.75 ± 1.4	18.0 ± 2.7
60	CONTROL	514 ± 474	24 ± 3	5.2 ± 1.3	15.8 ± 4.2
	TRATADOS	262 ± 118	26 ± 5	4.3 ± 1.9	8.9 ± 3.9
90	CONTROL	85 ± 12	24 ± 3	9.2 ± 1.2	26.4 ± 3.5
	TRATADOS	31 ± 6	26 ± 4	10.7 ± 1.6	30.6 ± 4.6
120	CONTROL	607 ± 275	45 ± 21	6.1 ± 0.3	17.2 ± 0.9
	TRATADOS	72 ± 22	12 ± 2	7.9 ± 0.8	14,5 ± 1.4
150	CONTROL	176 ± 53	25 ± 4	5.9 ± 1.1	17.1 ± 3.4
	TRATADOS	50 ± 6	14 ± 2.5	7.8 ± 0.5	14.2 ± 0.9
180	CONTROL	100 ± 18	27 ± 5	12.7 ± 1.8	28.4 ± 4.2
	TRATADOS	36 ± 9	22 ± 3	17.2 ± 3.2	31.3 ± 5.9

MEDIAS ± 1 DS en pg/mg de tejido testicular

Tabla nº XIII

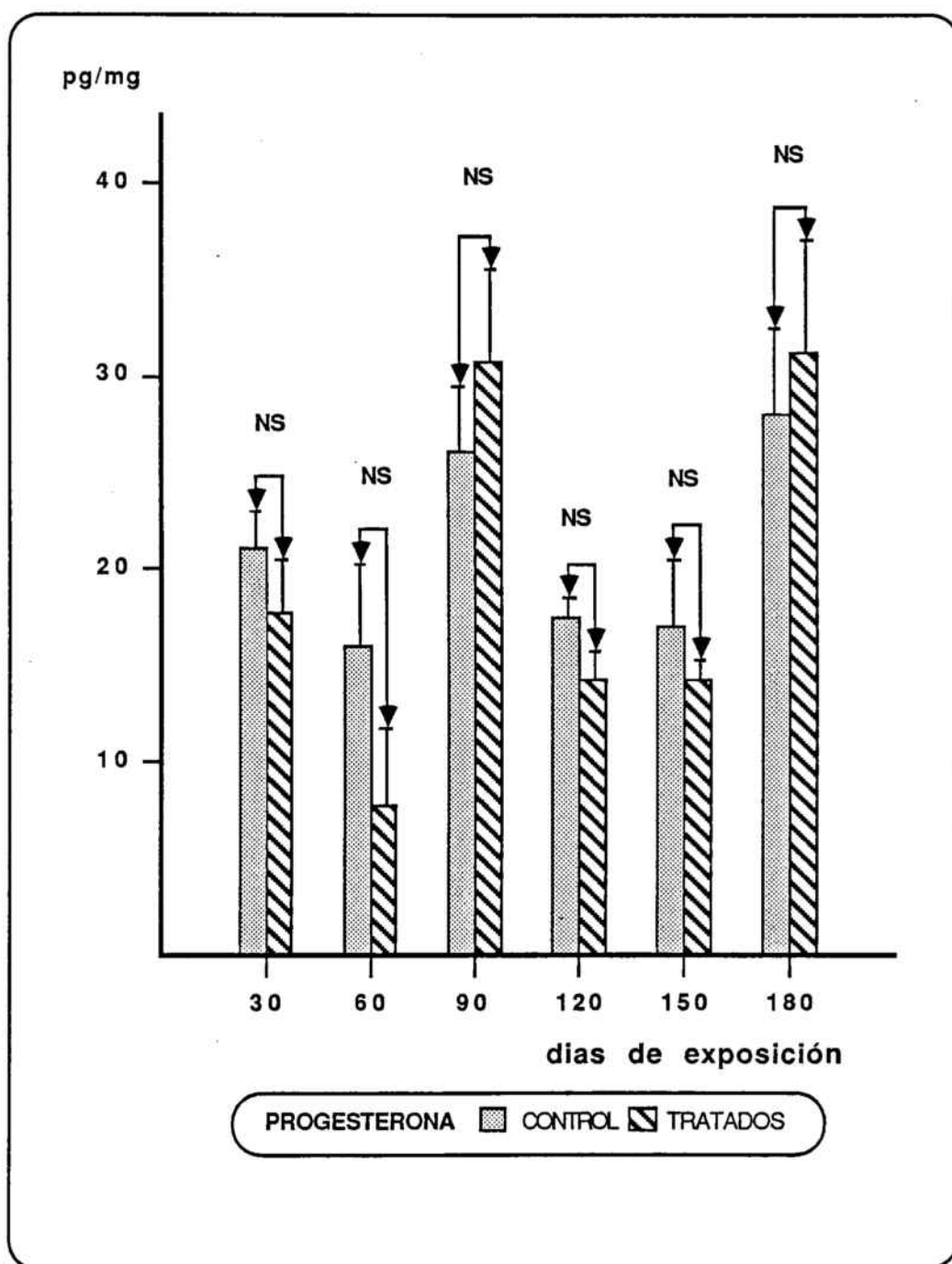


Figura nº 27

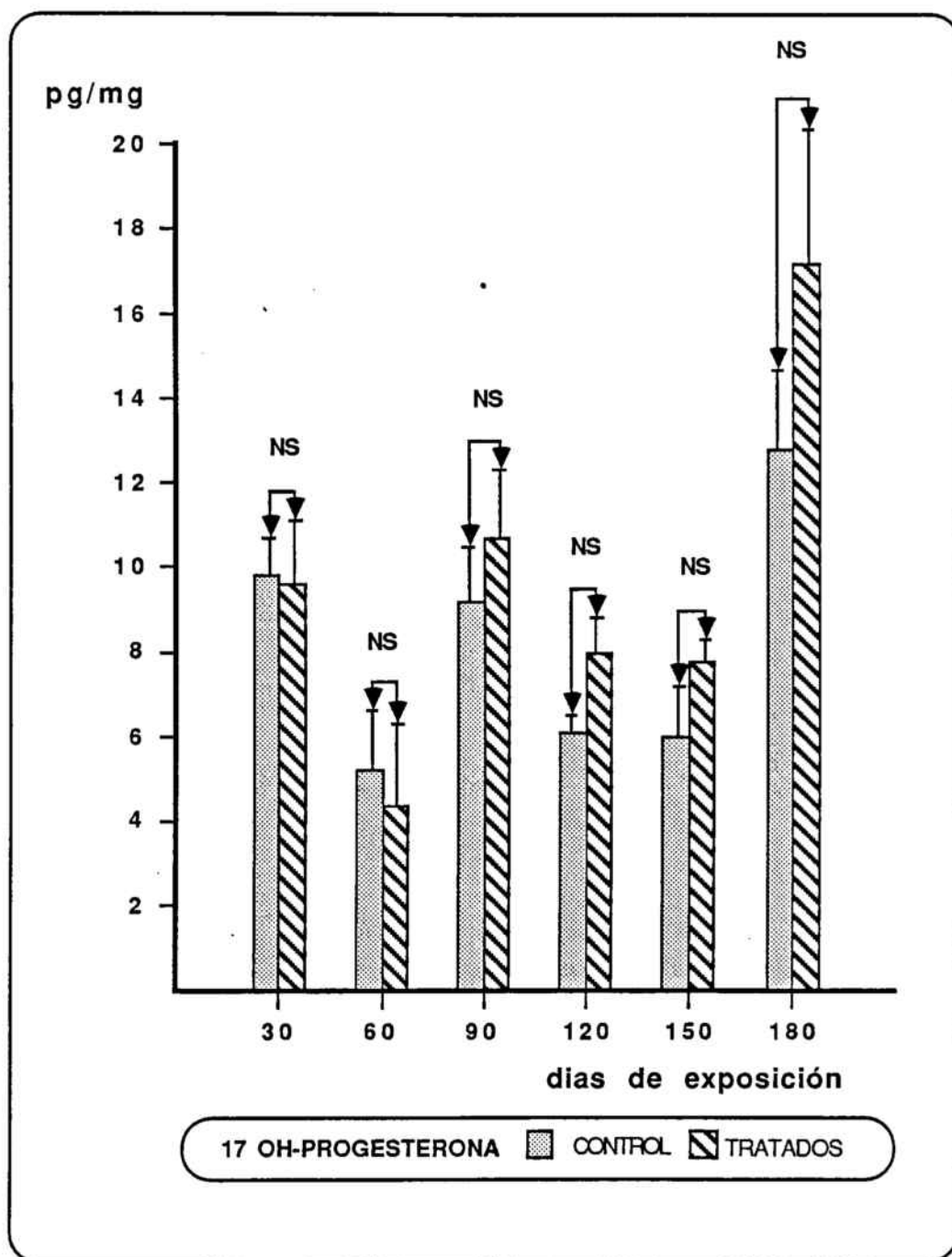


Figura nº 28

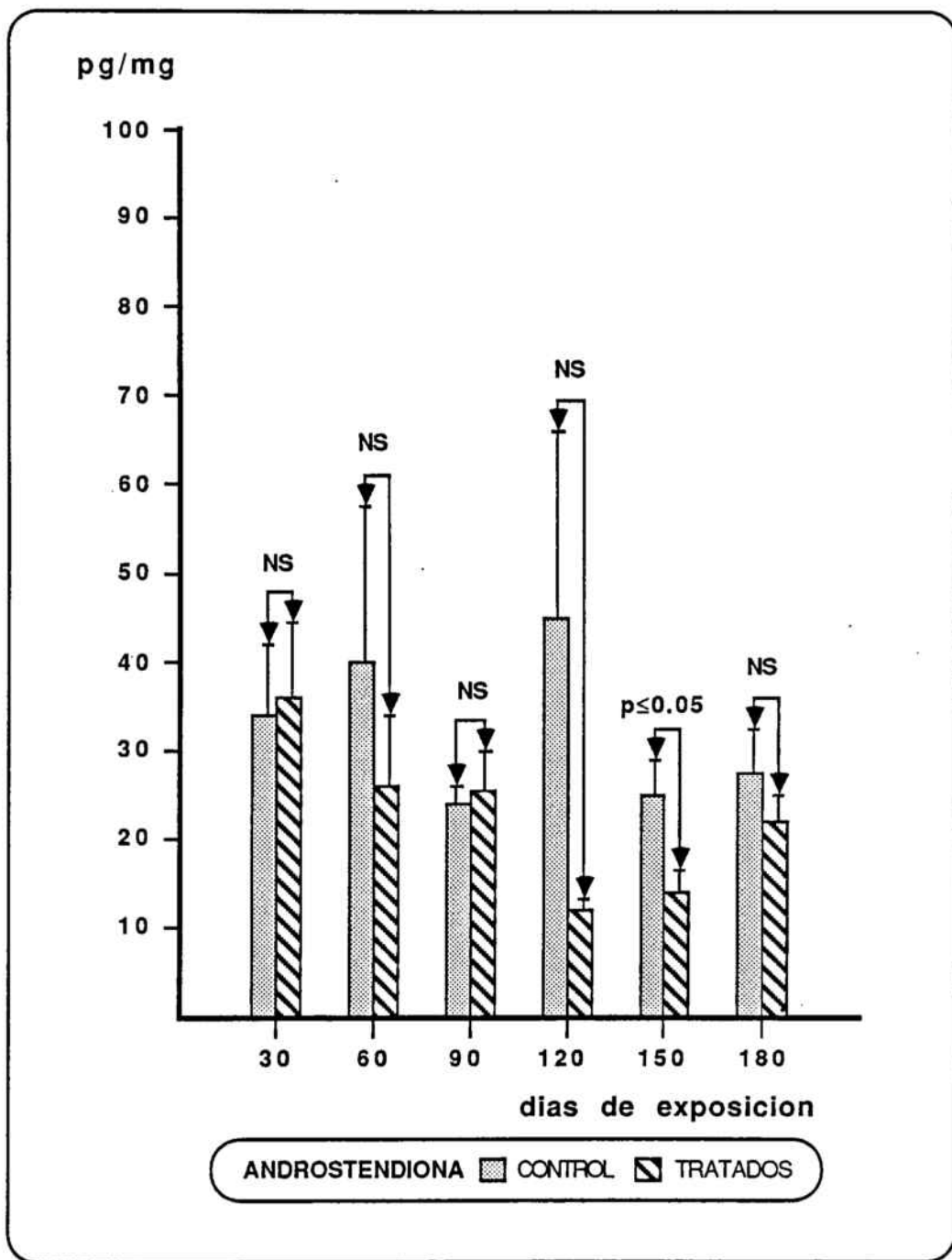


Figura nº 29

#### 4.3.5.4. Testosterona:

Aunque el comportamiento de la Testosterona en los dos grupos, control y tratado, es similar respecto de las oscilaciones a lo largo del ensayo, observamos una disminución de la concentración intratesticular en las ratas tratadas que, se hace significativa a partir del primer mes del ensayo ( $p \leq 0.05$ ), se confirma en el tercer mes ( $p \leq 0.01$ ), y se mantiene en el cuarto y quinto mes ( $p \leq 0.05$ ) tabla XIII y figura 30.

#### 4.3.6. Índices de producción Producto final/precursor.

A través del cociente ( índice ) entre producto final y su correspondiente precursor, podemos obtener un valor indirecto de la velocidad de producción del producto final, mediante la observación puntual de ambos productos en un momento determinado y en cada animal. En nuestro ensayo podemos observar este fenómeno seis veces en ratones control y otras seis en ratones tratados con 366 mg/l de acetato de plomo.

##### 4.3.6.1. Índice 17OH-Progesterona / Progesterona.

El índice del grupo control oscila a lo largo del ensayo entre 0.35 y 0.55, y el del grupo tratado, entre 0.30 y 0.50. No se producen diferencias significativas de los índices de producción de 17OH-Progesterona del grupo tratado frente al grupo control, ( $p \leq 0.25$ ), tabla XIV y figura 31.

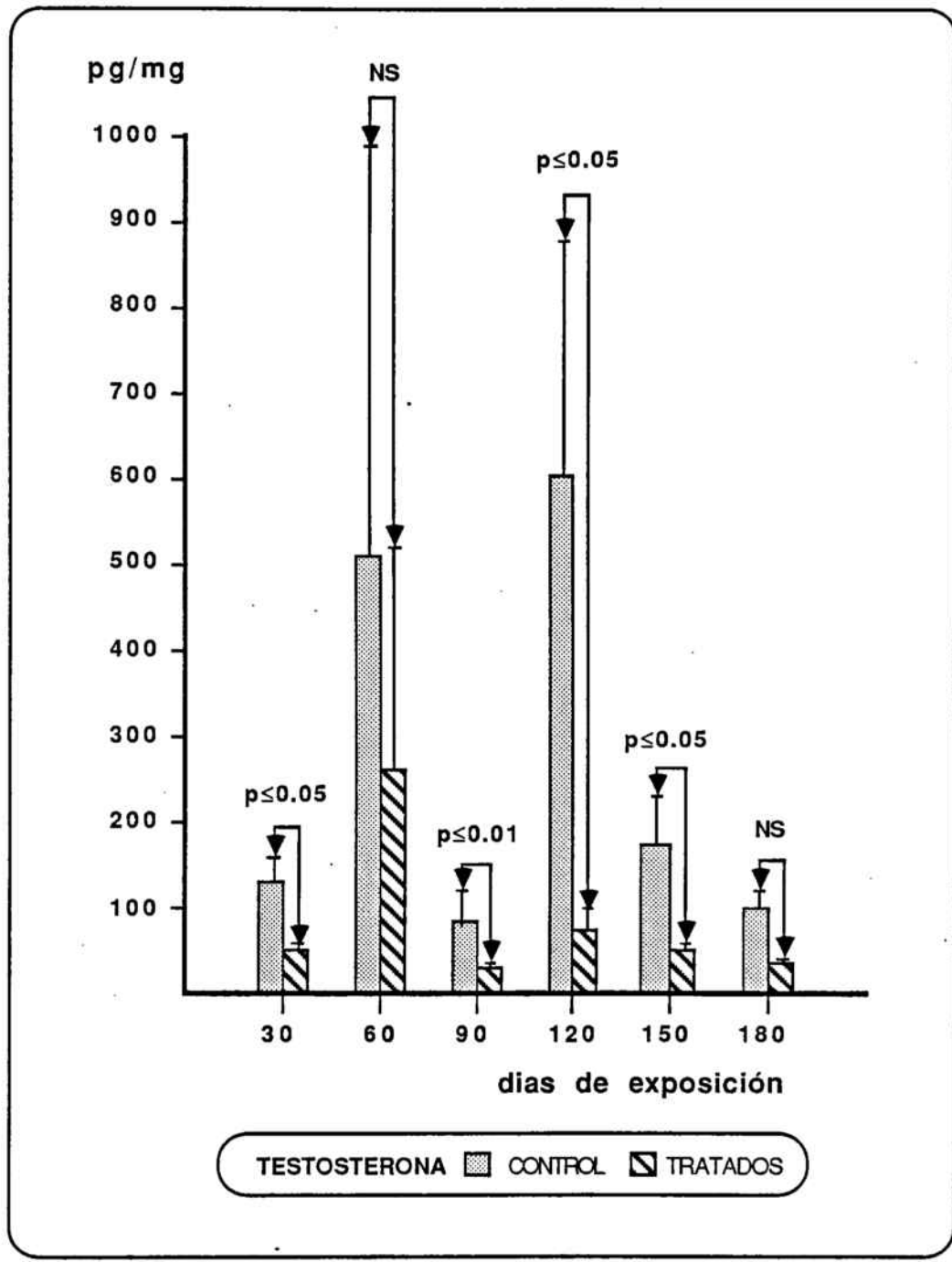


Figura nº 30



#### 4.3.6.2. Índice Androstendiona / 17OH-Progesterona.

En el grupo control se producen oscilaciones entre 2.5 y 8 a lo largo de todo el ensayo. El índice del grupo tratado oscila entre 2.4 y 7.4, en los primeros tres meses, para disminuir por debajo de 2 a partir del cuarto mes. Las diferencias de los cocientes del grupo control frente al tratado no son significativas los tres primeros meses (  $p \leq 0.25$  a  $p \leq 0.1$  ), pero sí en el cuarto, quinto y sexto mes, respectivamente (  $p \leq 0.025$ ,  $p \leq 0.005$  y  $p \leq 0.01$  ), tabla XIV y figura 32.

#### 4.3.6.3. Índice Testosterona / Androstendiona.

Las oscilaciones del índice del grupo control se sitúan entre 3.6 y 13.8 y las del grupo tratado entre 1.1 y 9.6. Las  $p$  de los índices control respecto del grupo tratado son significativas (  $p \leq 0.025$  ) a partir del tercer mes ; el primer y segundo mes ( 30 y 60 días ), no lo son (  $p \leq 0.25$  ), lo que indica una alteración significativa del índice de producción de testosterona de los ratones tratados a partir del tercer mes, que se mantiene entre éste y el quinto (  $p \leq 0.025$  ,  $p \leq 0.005$ ,  $p \leq 0.01$  ), frente al grupo control. Las diferencias dejan de ser significativas el último mes del ensayo (  $p \leq 0.1$  ), tabla XIV y figura 33.

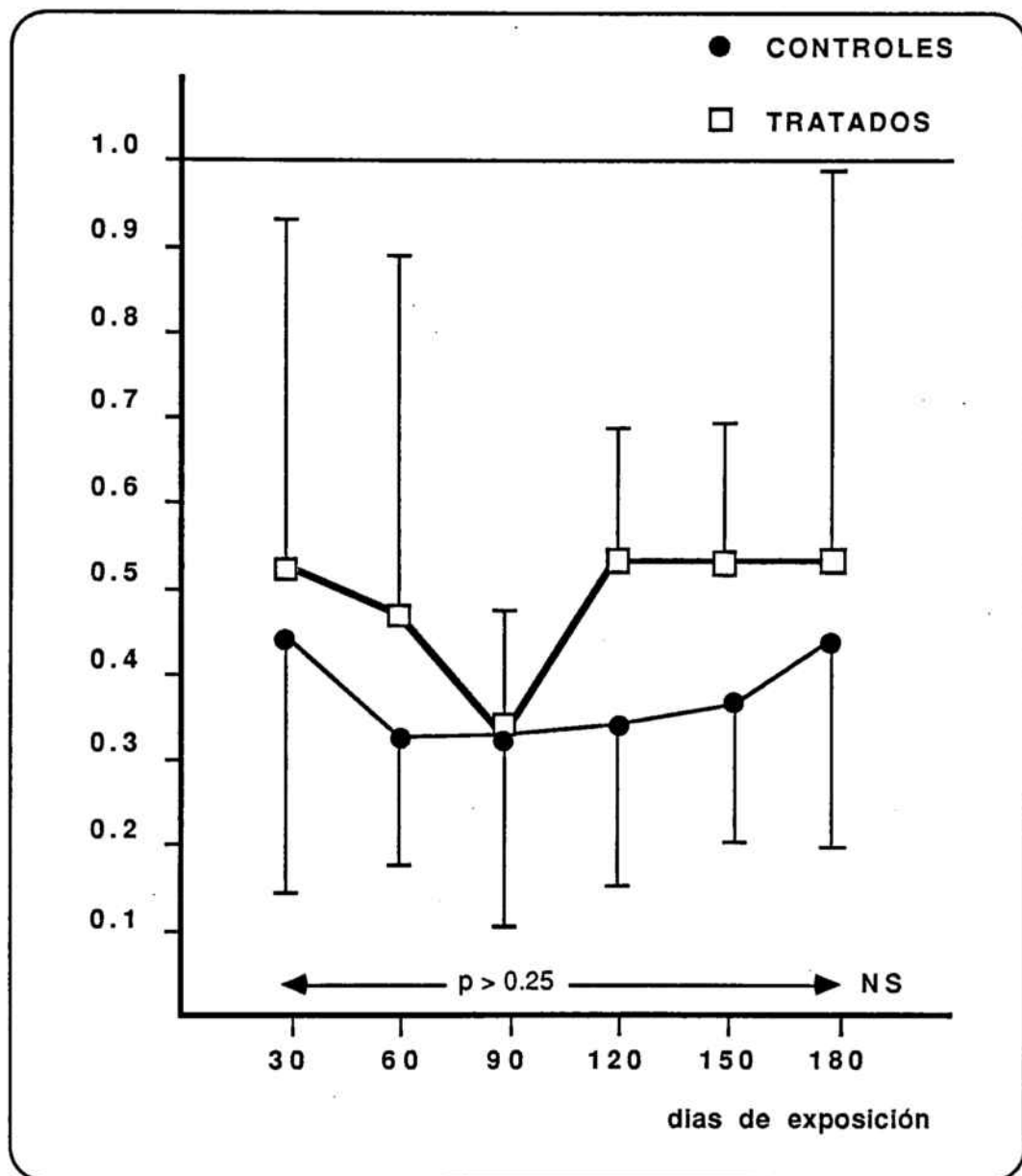
Estos resultados son coincidentes con los valores significativamente disminuidos de testosterona del grupo tratado frente al grupo control, figura 30.

**COCIENTES PRODUCTO FINAL / PRECURSOR**

días	grupo	T / A	A / 17OH-P	17OH-P / P
30	CONTROL	3.7 ± 1.63	3.56 ± 1.44	0.43 ± 0.25
	TRATADOS	1.6 ± 1.01	3.73 ± 0.35	0.54 ± 0.33
60	CONTROL	10.25 ± 6.64	7.41 ± 2.06	0.33 ± 0.13
	TRATADOS	9.58 ± 1.60	7.42 ± 4.54	0.49 ± 0.38
90	CONTROL	3.59 ± 1.03	2.68 ± 0.11	0.34 ± 0.24
	TRATADOS	1.19 ± 0.18	2.49 ± 0.05	0.34 ± 0.13
120	CONTROL	13.80 ± 1.59	9.54 ± 1.20	0.34 ± 0.17
	TRATADOS	5.96 ± 1.54	1.64 ± 0.46	0.54 ± 0.13
150	CONTROL	9.53 ± 0.31	4.16 ± 0.22	0.35 ± 0.16
	TRATADOS	3.61 ± 1.06	1.84 ± 0.26	0.55 ± 0.14
180	CONTROL	3.67 ± 0.52	2.13 ± 0.15	0.45 ± 0.19
	TRATADOS	1.71 ± 0.89	1.18 ± 0.05	0.55 ± 0.43

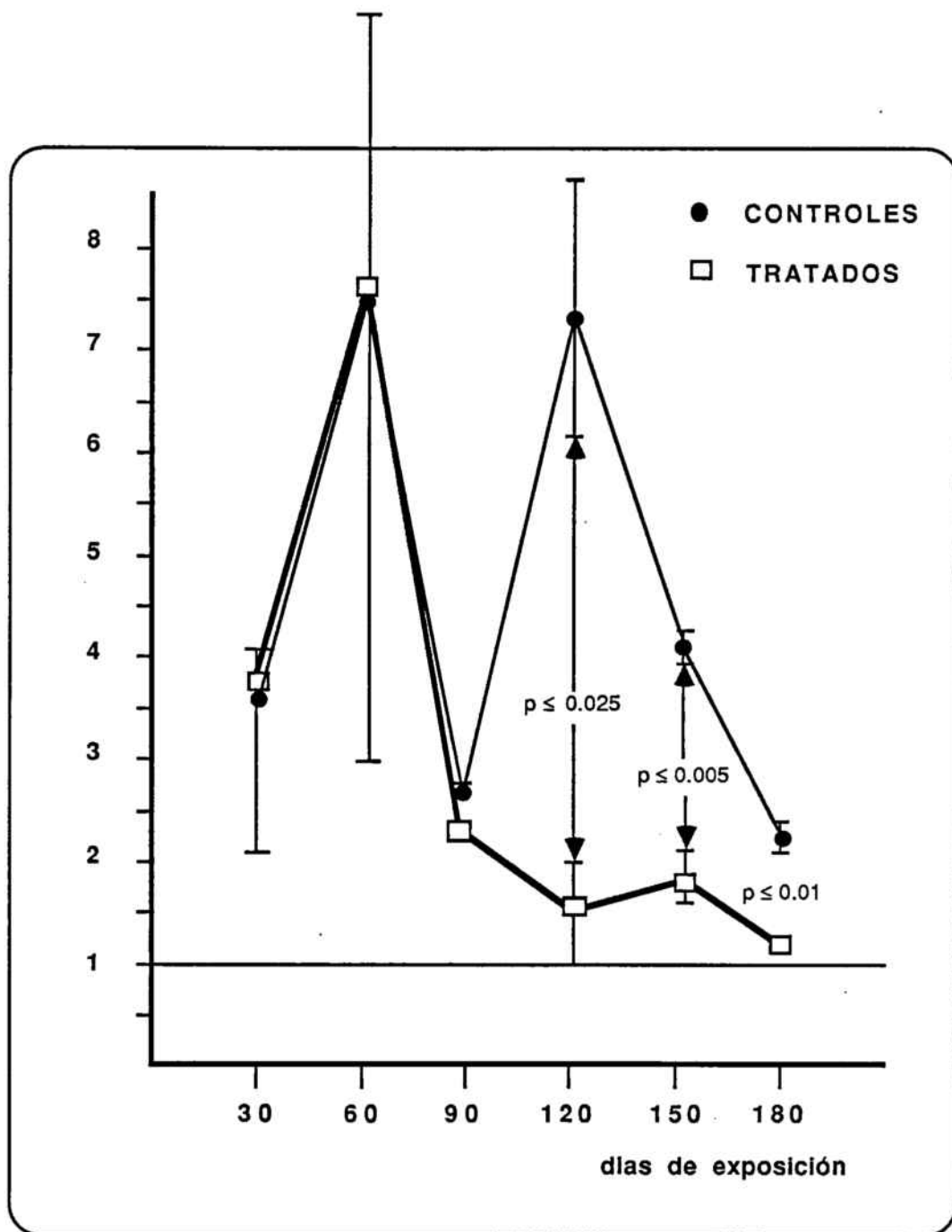
**MEDIAS ± 1 DS**

**Tabla nº XIV**



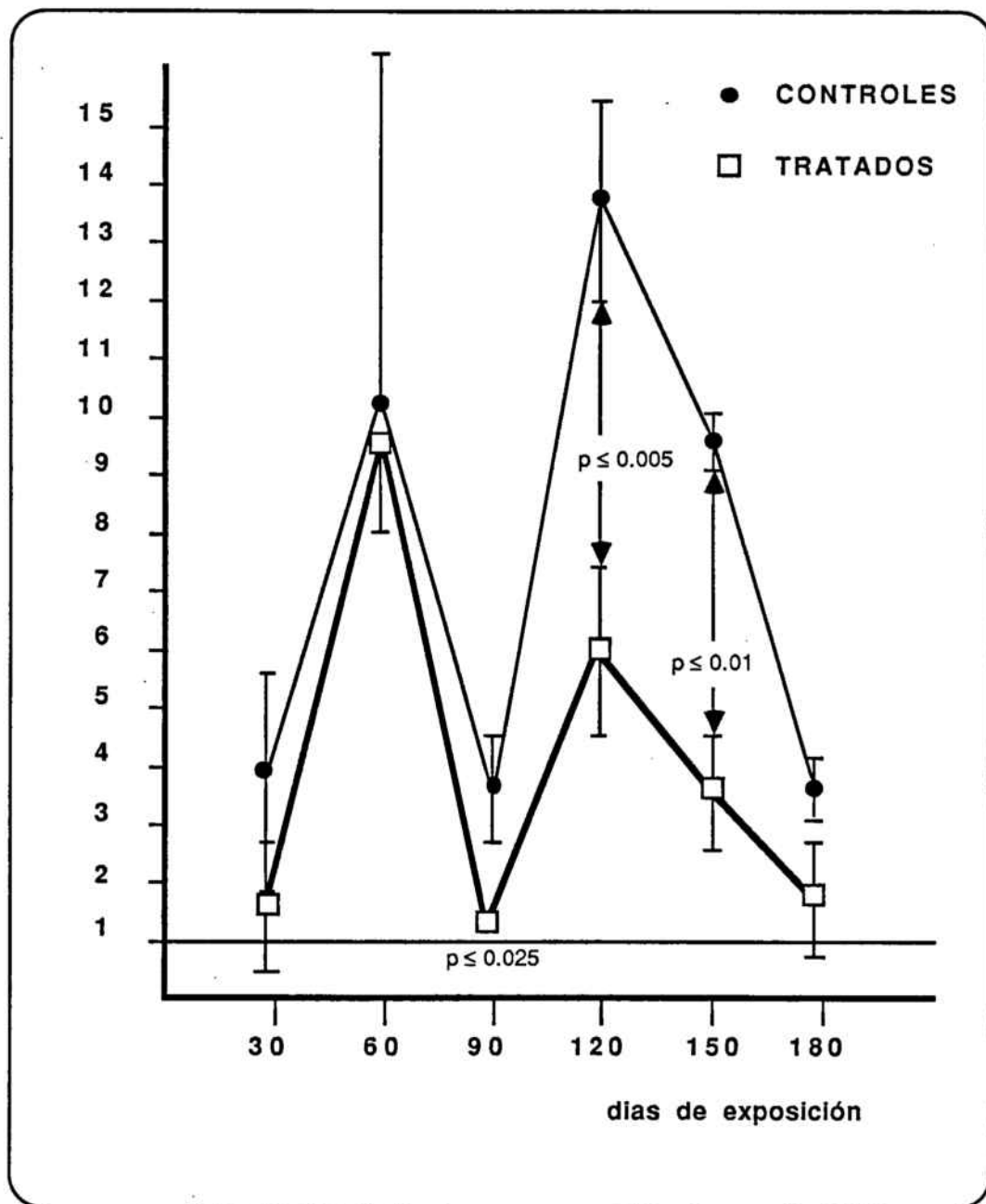
COCIENTES 17OH-PROGESTERONA / PROGESTERONA

Figura nº 31



COCIENTES ANDROSTENDIONA /17OH-PROGESTERONA

Figura nº 32



COCIENTES TESTOSTERONA/ ANDROSTENDIONA

Figura nº 33

## **5. DISCUSSION.**

## 5.1. En población laboral expuesta:

### 5.1.1. Plomo y Cinc-Protoporfirina IX intraeritrocitaria.

Los niveles de los marcadores de exposición laboral, Pb y ZPP, en este grupo de población expuesta son significativamente superiores a los de la población control (  $p \leq 0.001$  ). Estos resultados se correlacionan y coinciden con los obtenidos por la mayoría de los autores, indicando que los niveles de Pb y ZPP en los tres grupos expuestos expresan fundamentalmente la absorción diaria de este producto tóxico, y en ningún caso podemos considerarlos indicadores de intoxicación saturnina, ni de la acumulación de este metal en tejidos, ( Cantarow y Trumper, 1944, Lane, 1949 ).

Los niveles de Pb y ZPP de los distintos grupos se igualan a medida que transcurre el tiempo de exposición, aumentando los valores medios y haciéndose más pequeñas las desviaciones estandar. Este hecho nos hace pensar, que los depósitos tisulares de Pb se podrían saturar al cabo de un cierto tiempo de exposición continuada y constante, expresándose este efecto a través de incrementos de los valores de ZPP y Pb hasta unos determinados límites más elevados y uniformes en el compartimento sanguíneo ( fase de equilibrio ), que se modificarían cuando cambiaran nuevamente los niveles de absorción.

El hecho de que no se observe una correlación clara entre Pb y parámetros hormonales, y que ésta se insinue (  $r = -0.64$  ) en el grupo de mayor tiempo de exposición (  $>$  a 5 años ) entre Testosterona y uno de los marcadores de exposición laboral, la ZPP, apoyaría la tesis

de que la ZPP podría expresar mejor que el plomo en sangre, los niveles de Pb en determinados compartimentos tisulares.

La correlación negativa  $r = -0.64$ , ( $p \leq 0.05$ ), entre el ITL y la ZPP, así como los valores elevados de ZPP en el grupo de mayor tiempo de exposición ( $t > 5$  años), podrían explicarse, no sólo por el efecto directo del plomo sobre la síntesis del hemo, sino también por la disminución de testosterona libre. En el grupo 3, el plomo produce una disminución significativa de ITL ( $p \leq 0.01$ ), que podría afectar negativamente la síntesis del hemo con un aumento colateral de la ZPP, resultados que podrían explicarse con los trabajos realizados por Wibowo y Zielhius (1981), similares a los observados por Stuick y col. (1974), Alessio y col. (1977) y Roels y col. (1979). Wibowo y Zielhius, demostraron que, en dos grupos de conejos castrados y tratados con acetato de plomo, la administración de propionato de testosterona disminuía significativamente ( $p \leq 0.01$ ) el aumento de la concentración de ZPP inducida por el Pb inorgánico, respecto de los conejos castrados que no recibían estos andrógenos.

Es conocido que algunas hormonas, metabolitos esteroideos 5  $\beta$ -Hidroxilados, afectan la biosíntesis de las porfirinas, (Granick y Kappas, 1967), (Congote y col., 1974), y que la testosterona puede estimular la eritropoyesis, (Mirand y col., 1965), (Naets y Witlek, 1966) y (Gordon y col., 1970).

#### 5.1.2. Parámetros del eje hipotalamo-hipofiso-testicular.

La alteración de la función endocrina testicular empieza a ser



significativa ( T/SBG  $p < 0.05$  ) en el grupo 2, confirmándose ( T  $p < 0.01$ , SBG  $p < 0.025$  y T/SBG  $p < 0.001$  ) en el grupo 3, indicando relación entre tiempo de exposición y disfunción testicular.

Al valorar los resultados de T y del ITL, y sus diferencias significativas en estos grupos de trabajadores expuestos, respecto del grupo control, se observa que el índice de testosterona libre es el parámetro que más sensiblemente nos indica la alteración endocrina testicular en estos trabajadores expuestos.

El aumento significativo del valor medio de la LH, ya de manifiesto en el grupo 1, no es progresivo en los otros grupos de mayor tiempo de exposición. No existen diferencias significativas en la LH entre los distintos grupos de exposición laboral.

El hecho de que no existan diferencias significativas en los niveles de FSH entre los diferentes grupos de población laboral expuesta, sin manifestaciones clínicas de intoxicación por plomo, y la población control, ni entre esos grupos, indicaría que las alteraciones de la espermatogénesis, observadas por Lacranjan y col. ( 1975 ), se producen por un efecto directo, o como consecuencia de una intoxicación aguda, ( Brausntein y col., 1978 ), o indirectamente, a través de una disminución de la síntesis de Testosterona, que podría llegar a afectar la espermatogénesis independientemente de las concentraciones de FSH.

Los niveles significativamente elevados de LH en el grupo 1, con niveles normales de T, indicarían que dicha normalidad es debida a que, por el mecanismo de retroalimentación, la hipófisis compensaría la función endocrina testicular.

En el grupo 2, y más claramente en el grupo 3, que es el grupo con mayor tiempo de exposición, la disminución de las cifras de testosterona sin un mayor aumento de las cifras de LH, indican que la disfunción testicular no llega a compensarse con el aumento de la función Hipotálamo-Hipofisaria.

Los resultados obtenidos por Donovan y col. ( 1980 ), sobre inhibición de la unión a receptores de dihidrotestosterona, en prostata y vesícula seminal, describen disminuciones de un 50 % de unión a receptores prostáticos o de glándulas seminales a concentraciones de  $9 \times 10^{-4}$  a  $9 \times 10^{-3}$  M de Pb en estos citosoles ( 187  $\mu\text{g/g}$ . a 1870  $\mu\text{g/g}$ , *in vitro* ). Estos niveles son extraordinariamente superiores a los encontrados en el diseño experimental *in vivo*. Las concentraciones de Pb en testículo obtenidas en animales de experimentación, siempre son inferiores a 1 $\mu\text{g/g}$  de tejido y mantienen durante todo el ensayo, niveles de Pb en sangre similares a los obtenidos en población laboral expuesta, Todo lo anteriormente expuesto, teniendo en cuenta los niveles de Pb en testículos y tejidos en ratones Balb C y extrapolando a esta población laboral, apoyaría la tesis de que en estos trabajadores expuestos, no sólo no es de esperar que se produzcan alteraciones de los receptores androgénicos de dihidrotestosterona a nivel prostático y seminal, sino que podemos aceptar que no se produzcan alteraciones de los receptores de LH y FSH a nivel testicular, ni de los de testosterona y estradiol a nivel hipotalámico e hipofisario.

Los resultados de Pb en cerebro, a nivel experimental, indican que el comportamiento de este tejido no sigue el mismo patrón que el resto

de los "tejidos blandos" del modelo tricompartmental de Rabinovitz y col. ( 1973 ). Este hecho, y los resultados obtenidos por Petrusz y col. ( 1979 ) en los que no detectan plomo (  $< 0.01 \mu\text{g/g}$  ), ni diferencias de peso significativas en la hipófisis de ratas recién nacidas tratadas, apoyarían la tesis de que el efecto del Pb a nivel central sería poco importante en población expuesta, y más importante en población intoxicada con clínica de saturnismo, ( Braunstein y col., 1978 ), en la que se alterarían los patrones de redistribución, pudiendo alcanzar en este órgano diana concentraciones más elevadas que en los trabajadores expuestos. Los trabajos autorradiográficos de Stumpf y col ( 1980 ), utilizando  $^{210}\text{Pb}$ , apoyan los argumentos de alteración a nivel central , ya que detectan este metal en la eminencia media del hipotálamo.

Debemos añadir que los resultados obtenidos a nivel experimental confirman algunas de las opiniones anteriormente mencionadas. Las concentraciones de plomo en testículo, aún siendo más bajas que en otros tejidos, significativamente más elevadas que en el grupo control, y manteniéndose constantes a lo largo del ensayo, son capaces de producir disminuciones significativas de Testosterona a partir de los 30 días, y de Androstendiona a partir de los 150 días.

### 5.1.3. Hormonas suprarrenales.

Los resultados de Testosterona y el Índice de Testosterona libre en estos grupos de trabajadores expuestos, podrían explicarse por una disminución global de la síntesis de esteroides a través de un mecanismo más amplio e inespecífico que afectaría diversos procesos

enzimáticos.

La concentración de Cortisol y Dehidroepiandrosterona sulfato en el suero de los trabajadores expuestos respecto de la población control, no están significativamente disminuidas en ninguno de los grupos de exposición.

Estos resultados analíticos, y la ausencia de patología específica, descartarían una afectación global de la síntesis de esteroides, y apoyarían la hipótesis de que el plomo inorgánico a bajas concentraciones puede producir alteraciones específicas de las células de estirpe germinal, posiblemente más sensibles que las células de estirpe somática.

## 5.2. En animales de experimentación.

### 5.2.1. Generales.

Los valores obtenidos de Testosterona y sus precursores de la vía  $\Delta^4$  de la síntesis de esteroides, confirman una secreción pulsátil y rítmica. Estos ritmos ( oscilaciones ) afectan al mismo tiempo a la población control y al grupo tratado, lo que confirma fenómenos rítmicos de mayor o menor actividad biosintética en el testículo.

### 5.2.2. Plomo en tejidos.

Se observa claramente que el plomo se acumula en forma selectiva en determinados órganos diana: riñón, hígado y especialmente huesos, en forma similar a la descrita por Aub, Minot y

Fairhall. A nivel del compartimento sanguíneo, las concentraciones del grupo tratado se mantienen a lo largo del ensayo elevadamente constantes y claramente significativas ( $p < 0.001$ ) respecto del grupo control. Algo similar sucede a nivel testicular y cerebral; los ratones tratados presentan a lo largo del ensayo concentraciones superiores respecto del grupo control, pero sin incrementarse a lo largo del ensayo, manteniéndose en un nivel inferior a  $1 \mu\text{g/g}$  en testículo e inferior a  $0.6 \mu\text{g/g}$  en cerebro.

Los resultados de Pb obtenidos por Chowdhury y col. ( 1984 ), en testículos de ratas tratadas con acetato de plomo no siguen el mismo comportamiento que la mayoría de los tejidos del compartimento " tejidos blandos " de Rabinowitz, encontrándose valores inferiores a los de otros tejidos ( riñón e hígado ). Este hecho puede explicarse por la existencia de una barrera hemato-testicular que segrega el compartimento gonadal del compartimento sanguíneo, ( Plechaty y col., 1977 ). Datos confirmados en parte por Butrimovitz y col. ( 1983 ) , en los que atribuye la procedencia del Pb en el semen humano, y sus efectos sobre el número y morfología de los espermatozoides al plasma seminal y no al esperma procedente del testículo, mediante la comparación de dos grupos de voluntarios sanos, normales y vasectomizados. Nuestra experiencia en este campo nos confirma que existe una amplia variedad de compartimentos que presentan barreras biológicas al Pb, como el compartimento cerebral y testicular , en las intoxicaciones crónicas. El comportamiento del plomo en las intoxicaciones agudas, en su primera fase, sigue un modelo de distribución y absorción, flujo sanguíneo dependiente, completamente distinto al de las intoxicaciones crónicas.

### 5.2.3. Marcadores biológicos de exposición laboral en sangre de ratones tratados.

#### 5.2.3.1. Cinc-Protoporfirina IX intraeritrocitaria.

A lo largo del ensayo ( 180 días ), no se producen aumentos significativos de esta porfirina respecto del grupo control. Por tanto hemos de suponer: a) que no se producen en este periodo de tiempo, alteraciones de los sistemas enzimáticos intramitocondriales y en concreto de la *hemosintetasa* ( *ferroquelatasa* ), o b) que si estos se producen, derivarían a Protoporfirina IX libre intraeritrocitaria, que no llegarían a quelarse con Cinc, y por tanto no rendiría ZPP como en los trabajadores expuestos.

#### 5.2.3.2. $\delta$ Aminolevulinato deshidratasa.

La disminución de la actividad de esta enzima en el grupo tratado respecto del grupo control se mantiene significativamente disminuida (  $p \leq 0.01$  ) y constante a lo largo del ensayo, comportándose de forma similar a la concentración de plomo en sangre, indicando la magnitud de la dosis diaria absorbida de plomo inorgánico.

### 5.2.4. Parámetros hormonales de la vía $\Delta^4$ .

#### 5.2.4.1. Progesterona.

El hecho de que no se observen diferencias significativas a lo

largo del ensayo entre el grupo tratado y el grupo control, indicaría que no existen alteraciones en las vías enzimáticas del metabolismo de este intermediario. Hemos de suponer que no se produce una disminución de la actividad  $\Delta$ -3 $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa isomerasa ( enzima no perteneciente al sistema P-450 ), que regula a nivel del retículo endoplasmático el paso de pregnenolona a progesterona. El hecho de que no observemos acumulación de este precursor, podría explicarse por la derivación de este hacia otras rutas metabólicas.

#### 5.2.4.2. 17OH-Progesterona.

Al igual que en la Progesterona, no se observan diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado, lo que indicaría que no se producen alteraciones de la actividad enzimática de esta vía de producción. Debemos recordar que la 17 $\alpha$ -hidroxilasa, que transforma la Progesterona a 17OH- Progesterona, forma parte del sistema P-450<sub>c17</sub> del retículo endoplasmático y por tanto debemos suponer que no se produce inhibición de este enzima por efecto del plomo inorgánico.

#### 5.2.4.3. Androstendiona.

La androstendiona disminuye significativamente a partir del quinto mes de tratamiento ( 150 días ) (  $p \leq 0.05$  ), lo que indica que inicialmente no se altera la actividad de la 17,20-liasa de la P-450<sub>c17</sub>,



pero al sobrepasar ese tiempo de exposición el plomo llega a inhibir parte de estos sistemas enzimáticos.

#### 5.2.4.4. Testosterona.

La disminución de testosterona en el grupo tratado se hace significativa a partir de los 30 días (  $p < 0.05$  ) se hace no significativa a los 60 días, (  $p \geq 0.25$  ) y vuelve a disminuir a partir de los 90 días, (  $p \leq 0.01$  a  $p \leq 0.05$  ). Esta pérdida de significación podría explicarse al valorar uno de los puntos de menor actividad testicular. Debemos recordar que muchos déficits enzimáticos en la síntesis de esteroides , se detectan en los momentos de mayor producción hormonal.

Esta recuperación de T, que se produce a los 90 días, podría explicarse por un aumento de LH que compensaría la inhibición inicial de la *17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa*, activando sistemas enzimáticos mitocondriales, tipo P-450<sub>scc</sub> y/o del retículo endoplasmático P-450<sub>c17</sub>, que aumentarían la concentración del precursor ( androstendiona ), desplazando la reacción hacia la formación de testosterona.

La disminución de testosterona que se produce a partir de los 90 días, podría explicarse por un doble mecanismo de inhibición enzimática de la *17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa* ( NADPH dependiente ) del retículo endoplasmático liso , de la *17,20-liasa* y *17alfa-hidroxilasa* del sistema P-450<sub>c17</sub>, y por una inhibición parcial de la síntesis de LH a nivel hipofisario.

El hecho de que no se produzcan aumentos significativos de la ZPP



en los ratones expuestos, indicaría que no se producen alteraciones de la *hemosintetasa* intramitocondrial, y por tanto, podemos suponer que a las dosis y tiempos de exposición descritos , no se alteran los sistemas P-450scc intramitocondriales responsables de la conversión de colesterol a pregnenolona. Las elevadas concentraciones de ZPP en los trabajadores expuestos, indican que se produce una importante inhibición de la actividad *hemosintetasa* , y por consiguiente es pensable que se produzcan alteraciones no solo de los sistemas enzimáticos citoplasmáticos, sino que también se vean implicados los sistemas P-450scc intramitocondriales, especialmente en los trabajadores de más de 5 años de exposición.

Las concentraciones de testosterona intratesticulares obtenidas en el grupo tratado a lo largo de todo el ensayo, son comparables a las obtenidas por Sokol y col. ( 1985 ), que utilizan concentraciones de acetato de plomo en agua de bebida entre 1000 mg/L y 3000 mg/L.

Las importantes oscilaciones de los resultados de testosterona, tanto del grupo control como del grupo tratado, a lo largo del ensayo, coinciden con los resultados obtenidos por Mock & Frankel ( 1978 ), de Sanford y col ( 1984 ) y Nieuwenhuijsen y col. ( 1987 ), que describen ritmos estacionales y circanuales de testosterona.

**6. RESUMEN.**

## RESUMEN :

Los resultados obtenidos en población laboral expuesta y en animales de experimentación, nos permiten sugerir el siguiente mecanismo de acción del plomo sobre la función endocrina testicular:

El plomo se absorbe fundamentalmente a través de dos vías, la respiratoria y la digestiva. En población laboral expuesta la vía respiratoria es la más importante, aunque algunos autores apuntan que, en función de los hábitos higiénicos, la vía digestiva puede llegar a ser tan importante como la respiratoria. Este sería el caso de la población laboral estudiada, que tras una investigación en profundidad del ambiente laboral, hábitos higiénicos y las escasas medidas de protección y seguridad, confirman que la vía digestiva puede llegar a ser tan importante como la respiratoria.

En el modelo experimental que hemos diseñado, utilizamos como única vía de absorción de Pb inorgánico la vía digestiva. A pesar de que, utilizando este modelo, se logran concentraciones de Pb en sangre similares a las de los trabajadores expuestos, el significado biológico y toxicológico de estas concentraciones, en este compartimento en los animales de experimentación, puede ser completamente distinto al de la población laboral expuesta, y los valores de plomo acumulado en tejido no extrapolables.

El posible mecanismo de acción del plomo inorgánico en los trabajadores expuestos, supone una fase inicial de absorción, por vía respiratoria y digestiva, distribución a través del compartimento sanguíneo, y posterior acumulación, según afinidad tisular.

A partir de este momento se produce un aumento significativo de Pb en tejidos blandos, pero de menor cuantía en SNC y testículos. Son estas concentraciones de Pb a nivel testicular las que producirían una disminución de la síntesis de testosterona, por inhibición de algunos sistemas enzimáticos del retículo endoplasmático liso, actuando fundamentalmente sobre la actividad *17 $\beta$ -Hidoxiesteroide deshidrogenasa* ( enzima no perteneciente al sistema P-450 ), que convierte la Androstendiona en Testosterona. Esta disminución de la concentración de Testosterona se compensa inicialmente por un mecanismo de retroalimentación negativo a nivel hipofisario , ampliamente descrito y aceptado, que desencadena un aumento de la producción de LH, que a su vez activa el proceso de síntesis de testosterona en las Células de Leydig, incrementando la producción de AMPc, y la posterior transformación de colesterol en pregnenolona en los citocromos P-450<sub>sc</sub> intramitocondriales. Si continúan sometidos a esta exposición, y suponiendo que la concentración de Pb en testículo no aumenta a lo largo del tiempo, en estos trabajadores expuestos ( siguiendo el mismo comportamiento que en el modelo experimental ), se podrían producir inhibiciones de otros sistemas enzimáticos, como el de la *17,20-liasa ó 17alfa-hidroxilasa* del sistema P-450<sub>c17</sub>. Posiblemente, en una fase posterior y a través de un mecanismo de redistribución compartimental del plomo acumulado ( de retículo endoplasmático liso o hialoplasma, a mitocondrias ), afectaría los sistemas enzimáticos del compartimento mitocondrial P-450<sub>sc</sub>. Cuando el plomo alcanza el compartimento mitocondrial , el aumento inicial de LH no es capaz de compensar la disminución de

testosterona. Esta incapacidad de síntesis de las células de Leydig podría deberse a una afectación profunda de estos sistemas enzimáticos, fundamentales en la producción de esteroides, especialmente sensible en las células de estirpe germinal.

Esta hipótesis y su secuencia en el tiempo, puede apoyarse en los resultados obtenidos en trabajadores expuestos y animales de experimentación, a través de dos marcadores de exposición laboral, la actividad *ALA-D* y la ZPP, marcadores del compartimento del retículo endoplasmático liso y mitocondrial ( eritrocitario y eritroblástico ) respectivamente. Estos resultados indican que la inhibición se produce inicialmente en el retículo endoplasmático liso, con disminución significativa de la actividad *ALA-D* , y posteriormente en las mitocondrias con aumentos significativos de la ZPP, que indican disminución de la actividad *hemosintetasa* mitocondrial.

A este efecto periférico ( testicular ), producido por el Pb inorgánico, podría añadirse un mecanismo de acción a nivel central ( hipotálamo-hipofisario ), que inhibiría la síntesis de LH inducida por el mecanismo de retroalimentación negativa que genera la disminución primaria de testosterona.

Podemos pensar que el mecanismo de acción primario del Pb a nivel del eje hipotálamo-hipofiso-testicular es periférico, subdividiéndose en dos etapas, la primera citoplasmática, y la segunda mitocondrial. El mecanismo secundario es de tipo mixto, periférico ( testicular ) y central ( hipotálamo-hipofisario ). Es posible que exista una tercera fase, más tardía o en intoxicaciones agudas, que afectaría

los dos niveles anteriormente citados, más una inhibición de neurotransmisores ( norepinefrina y dopamina ) a nivel del SNC, que podrían afectar la producción de GnRH a nivel hipotalámico.

## **7.CONCLUSIONES.**

### En población laboral expuesta:

- Ninguno de estos trabajadores expuestos al plomo inorgánico, presentó a lo largo del año de estudio, signos o síntomas de intoxicación por plomo ( gota saturnina, dolores cólicos abdominales, neuropatía periférica, encefalopatía , etc. ).

- Los niveles de plomo y ZPP en sangre eran superiores a los límites establecidos en el "Reglamento para la prevención de riesgos y protección de la salud de los trabajadores por la presencia de plomo metálico y sus compuestos iónicos en el ambiente de trabajo ", B.O.E. nº 98, de 24 de Abril de 1986 , según criterios y normas marcadas sobre esta materia, por el Consejo de la Comunidad Económica Europea de 28 de Julio de 1982, lo que demuestra que las medidas de protección, seguridad e higiene en el trabajo no se cumplían adecuadamente.

- Los niveles de Pb en sangre son significativamente elevados en los tres grupos de trabajadores expuestos, concluyendo que la determinación de este metal en sangre es un buen indicador de absorción diaria.

- La ZPP es un marcador específico y sensible de exposición laboral al plomo, aunque no nos indica el nivel de impregnación tisular de plomo, ni se correlaciona con la posibilidad de desarrollar patología saturnina.



- Se produce una disminución significativa de testosterona (  $p < 0.01$  ), en el grupo de más de cinco años de exposición.

- En el grupo 3 ( trabajadores de 1 a 5 años), observamos una disminución significativa (  $p \leq 0.05$  ) del índice de testosterona libre ITL .

- En el grupo de trabajadores de más de 5 años observamos una disminución significativa (  $p \leq 0.01$  ) del ITL.

- El ITL es el parámetro que mejor expresa el grado de disfunción testicular en estos trabajadores expuestos.

- La LH está significativamente más elevada en todos los grupos de población laboral expuesta.

- El aumento de LH en todos los trabajadores expuestos indica que no existe alteración observable a nivel Central ( hipotálamo - hipofisario ).

- No se observan alteraciones significativas de la FSH en los trabajadores expuestos.

- El aumento significativo de LH en todos los grupos de trabajadores expuestos, sin patología plúmbica ( neuropatías, gota, cólicos abdominales, etc ), indica que la hipófisis no ha perdido su capacidad de respuesta ante la disminución constante y progresiva de T, lo que sugiere que en este colectivo estudiado no se producen

alteraciones valorables a nivel del sistema nervioso central. ( hipotálamo- hipófisis. )

### En animales de experimentación.

- No se producen disminuciones significativas del peso corporal en animales tratados respecto del grupo control.

- Se produce una disminución significativa (  $p \leq 0.05$  ) del tamaño testicular a los 60 días de tratamiento con acetato de plomo, recuperándose posteriormente a partir de los 90 días.

- El aumento de plomo en hueso es progresivo y significativamente superior al del grupo control (  $p \leq 0.001$  ). Es el órgano diana por excelencia, con la mayor acumulación de plomo de todos los tejidos, 70  $\mu\text{g/g}$  de tejido.

-El aumento de plomo en hígado es progresivo y significativamente superior al del grupo control(  $p \leq 0.001$  ).

- El aumento de plomo en riñón es progresivo y significativamente superior al del grupo control (  $p \leq 0.001$  ).

- El aumento de plomo en sangre es significativamente superior al del grupo control (  $p \leq 0.01$  ) a lo largo del ensayo, pero se mantiene estable, de 50 a 70  $\mu\text{g/dL}$ , durante todo el ensayo.

- El aumento de plomo en cerebro es significativamente superior en el grupo tratado (  $p \leq 0.01$  ) a lo largo del ensayo, pero se mantiene estable, de 0.4 a 0.6  $\mu\text{g/g}$ , durante todo el ensayo.

- El aumento de plomo en testículos, es significativamente superior (  $p \leq 0.01$  ) , respecto del grupo control y a lo largo del ensayo, pero se mantiene estable, de 0.5 a 0.9  $\mu\text{g/g}$ , durante todo el ensayo.

- La actividad *ALA-D* intraeritrocitaria está significativamente disminuida (  $p \leq 0.01$  ) y estable en los animales tratados a lo largo de todo el ensayo.

- No se producen aumentos significativos de la ZPP intraeritrocitaria en los animales tratados durante los seis meses del ensayo.

- No se producen disminuciones significativas de Progesterona en los animales tratados respecto del grupo control.

- Se producen oscilaciones de las concentraciones de Progesterona en forma estacional .

- No se producen disminuciones significativas de 17OH Progesterona en los animales tratados respecto del grupo control.

- Se producen oscilaciones de las concentraciones de 17OH Progesterona en forma estacional .

- Las concentraciones de Androstendiona en testículos de ratas tratadas disminuyen a partir del quinto mes de exposición (  $p \leq 0.05$  ).

- Se producen oscilaciones de las concentraciones de Androstendiona en forma estacional.

- La disminución de testosterona en los animales tratados se produce a partir del primer mes (  $p \leq 0.05$  ), se recupera en el segundo mes ,  $p$  no significativa respecto del grupo control, y vuelve a disminuir a partir del tercer mes para mantenerse significativamente disminuida a lo largo del ensayo (  $p \leq 0.05$  a  $p \leq 0.01$  ).

## **8.- BIBLIOGRAFIA**

1.- Abraham GE.

Moderns Methods of Steroid Analysis.

ed. Erich Heftman.

New York: Academic Press, 1973.

2.- Abraham GE.

Radiassay Systems in Clinical Endocrinology.

New York & Basel: Marcel Dekker, 1981.

3.- Alessio L. Castoldi MR. Buratti M Maroni & Bertazzi PA.

Behaviour of some indicators on biological effect in female lead workers.

Med. Lav. 1977 ; 40 : 283-292.

4.- Alfano DD & Petit TL.

Neonatal lead exposure alters the dendritic development of hippocampel dentate granule cells.

Exp. Neurol. 1982 ; 75 : 275-288.

5.- Amore F.

Determination of cadmium, lead, thallium and nickel in blood by atomic absorption spectrometry.

Anal. Chem. 1974 ; 46 : 1597-1599.

6.- Aub JC & Reznikoff P.

"Lead estudiesIII. The effect of lead on blood cells" Part 3. A chemical exploration of the reaction of lead with red blood cells.

J. Exptl. Med. 1924 ; 40 : 189-208.

7.- Aub JC. Fairhall LT. Minot AS. & Reznikoff P.

Medicine 1925 ; 4 : 1-250.

citado en Hunter D. ( 1985 ).

8.- Aub JC. Robb GP & Rossmeisl E.

Lead studies. XVII. Significance of bone trabeculae in the treatment of lead poisoning.

J. Publ. Health 1932 ; 22 : 825-830.

9.- Batschelet E. Brand L. & Steiner A.

On the Kinetics of Lead in the Human Body,

J. Math. Biology. 1979 ; 8 : 15-23.

10.- Bauchinger M. Schmid E. Einbrodt HJ & Dresp J.

Chromosome aberrations in lymphocytes after occupational exposure to lead and cadmium.

Mutat. Res. 1976 ; 40 : 57-62.

11.- Bauchinger M. Dresp J. Schmid E. Englert N & Krause C.

Chromosome analyses of children after ecological lead exposure

Mutat. Res. 1977 ; 56 : 78-80.

12.- Baulieu E. Corpechot EC. Dray F. Emiliozzy R. Lebeau MC. Mauvais.

Jarvis P & Robel P.

An adrenal secreted androgen dehydro-iso-androsterone sulfat. Its metabolism and a tentative generalization on the metabolism of other steroid conjugates in man.

Rec. Prog. Horm. Res. 1965 ; 21 : 411-500.

13.- Baulieu EE & Robel P.

Catabolism of testosterone and androstendione.

In: " The androgens of the testis "

ed: K-B Eik-Nes

New York: Marcel Dekker, 1970.

14.- Becker W. & Snipes CA.

Shift with age in steady-state concentrations of androstendione and testosterone in incubations of guinea pig testis.

Biochem. J. 1968 ; 107 : 35-40.

15.- Belknap EL.

Clinical studies on lead absorption in the human subject. III. Blood pressure observations.

J. Industr. Hyg. Toxicol. 1936 ; 18 : 380-390.

- 16.- Bell JBG Vinson GP. Hopkins DJ & Lacy D.  
Pathways for androgen biosynthesis from ( 7- $\alpha$ H ) pregnenolona and ( 4- $^{14}$ C ) progesterone by rat testis interstitium in vitro.  
Biochem. Biophys. Acta. 1968 ; 164 : 412-420.
- 17.- Bell JU. & Thomas JA.  
Effects of lead on mammalian reproduction.  
in " Lead Toxicity "  
ed. RL. InSinghal & JA. Thomas,  
Baltimore & Munich: Urban and Schwarzenberg, 1980.
- 18.- Benignus VA. Otto DA, Muller KE & Seiple KJ.  
Effects of age and body lead burden on CNS function in young children II EEG spectra.  
Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 1981 ; 52 : 240-248.
- 19.- Berkaloff A. Bourguet J. Favard P & Lacroix JC.  
Biología y Fisiología celular, I Membrana plasmática.  
Barcelona: Omega, 1986.
- 20.- Bird CE. Murphy J. Burvomand K. Finnis W. Dressel D & Clark AF.  
Dehydroepiandrosterona : kinetics of metabolism in normal men and women.  
J. Clin. Endocr. Metabol. 1978 ; 47 : 818-822.
- 21.- Bjoerklund H. Palmer MR. Lind B. Hoffer BJ & Olson L.  
Postnatal lead exposure alters spontaneous cerebellar purkinje neuron discharge.  
Environ. Research. 1983 ; 31 : 448-459.
- 22.- Blumer W & Reich Th.  
Gesundheitsschädigung durch Bleibenzin ( Health injuries by leaded gasoline )  
Schweiz. Rundschau Med. ( Praxis ) 1975 ; 64 : 261-265.
- 23.- Blumer W & Reich Th.  
Bleibenzin und Krebsmortalität ( Leaded gasoline an cancer mortality )  
Schweiz. Med. Wschr. 1976 ; 106 : 503-506.
- 24.- Boyd GS.  
Biological Hydroxilation Mechanisms.  
ed: GS. Boyd & RMS. Smellie.  
New York & London: Academic Press, 1972.



- 25.- Brausntein GD. Dahlgen J & Loriaux L.  
Hypogonadism in Chronically lead-poisoned men.  
Infertility. 1978 ; 1 : 33-39.
- 26.- Brian C. Under BA. Vernon A & Green PD.  
Blood lead analysis-loss to storage containers.  
Clin. Toxicol. 1977 ; 11 : 237-243.
- 27.- Brodie KG & Stevens BJ.  
Whole blood lead and cadmium at low levels using automatic sample dispenser  
and furnace atomic absorption.  
J. Anal. Toxicol. 1977 ; 1 : 282-285.
- 28.- Bruchovsky N. & Wilson JD.  
The conversion of testosterone to 5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol-3-one by rat prostate in  
vivo and in vitro.  
J.Biol.Chem. 1968 ; 243 : 2012-2021.
- 29.- Butrimovitz GP. Sharlip I & Lo R.  
Extremely low seminal lead concentrations and male fertility.  
Clin. Chim. Acta. 1983 ; 135 : 229-231.
- 30.- Cantarow,A. & Trumper,M.  
Lead Poisoning.  
Baltimore: Williams & Wilkins, 1944.
- 31.- Castellino N. & Aloj S.  
Kinetics of the distribution and excretion of lead in the rat.  
Brit. J. Industr. Med. 1964 ; 21 : 308-314.
- 32.- Catt KJ. Tsuruhara T & Dufau ML.  
Gonadotrofin binding sites of the rat testis.  
Biochem. Biophys. Acta. 1972 ; 279 : 194-201.
- 33.- Catt KJ.  
Endocrinología fundamental.  
Barcelona: Toray, 1977.

34.- Cholak KJ. & Bombach K.

Measurement of industrial lead exposure by analyses of blood and excreta of workmen.

J. Industr. Hyg. Toxicol. 1943 ; 25 : 47-54.

35.- Chowdhury AR. Dewan A & Gandhi DN.

Toxic effect of lead on the testes of rat.

Biomed. Biochim. Acta. 1984 ; 43 : 95-100.

36.- Chyzzzer A.

Des intoxications par le plomb se presentant dans le ceramique en Hongrie.

Chir. Presse. ( Budapest ) 1908 ; 44 : 906-909.

37.- Cole LJ & Bachhuber LJ.

Effects of lead on the germ cells of the male rabbit and fowl as indicated by their progeny.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1914 ; 12 : 24-29.

38.- Congote LF. Stern MD & Solomon S.

Hormone control of heme synthesis in cultures of human fetal liver cells.

Biochemistry 1974 ; 13 : 4255-4263.

39.- Cooke BA. Lindh ML & Janszen FHA.

Correlation of protein kinase activation and testosterone production after stimulation of Leydig cells with luteinizing hormone

Biochem. J. 1976 ; 160 : 439-446.

40.- Corbella J

Notes històriques sobre el coneixement del saturnisme a Catalunya.

Actes III Congrés Història Medicina Catalana. 1981; I : 83-94.

41.- Cremer JE.

Biochemical studies on the toxicity of tetraethyl lead and other organo-lead compounds.

Brit. J. Industr. Med. 1959 ; 16 : 191-199.

42.- Cullen MR. Robins JM & Eskenazi B.

Adult inorganic lead intoxication : Presentation of new cases and review of recent advances in the literature.

Medicine 1983 ; 62 : 221-247.

- 43.- Cullen MR. Kayne RD & Robins JM.  
Endocrine and reproductive dysfunction in men associated with occupational inorganic lead intoxication.  
Arch. Environ. Health. 1984 ; 39 : 431-440.
- 44.- Dalldorf G & Williams RR.  
Improvement of reproduction in rats by ingestion of lead.  
Science 1945 ; 102 : 668-670.
- 45.- De Knudt GH. Leonard A & Ivanov B.  
Chromosome aberrations observed in male workers occupationally exposed to lead.  
Environ. Physiol. Biochem. 1973 ; 3 : 132-138.
- 46.- De Knudt GH. Manuel Y & Gerber GB.  
Chromosomal aberrations in workers professionally exposed to lead.  
J. Toxicol. Environ Health. 1977 ; 3 : 885-890.
- 47.- Demisch K. Magnet W. Neubauer M & Schoffling K.  
Studies about unconjugated androstendiol in human peripheral plasma.  
J. Clin. Endocr. Metab. 1973 ; 37 : 129-134.
- 48.- Der R. Fahim Z. Yousef M & Fahim M.  
Environmental interaction of lead and cadmium on reproduction and metabolism of male rats.  
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1976 ; 14 : 689-713.
- 49.- Di Ferrante E & Bourdeau P.  
Metabolism and distribution of radioactive and stable lead in man: In : " Proceedings of the International Symposium on Environmental Health Aspects of Lead. " Luxemburg: Commission of the European Communities, 1973.
- 50.- DiZerega GS & Sherins RJ.  
Endocrine control of adult testicular function.  
In: " The testis "  
ed: H. Burger & DM. Dekrester  
New York: Raven Press, 1981.

- 51.- Donovan MP. Schein LG & Thomas JA.  
Inhibition of androgen-receptor interaction in mouse prostate gland cytosol by divalent metal ions.  
Mol. Pharmacol. 1980 ; 17 : 156-162.
- 52.- Dorrington JH & Fritz IB.  
Effects of gonadotrophins on cyclic AMP production by isolated seminiferous tubules and interstitial cell preparations.  
Endocrinology 1974 ; 94 : 395-403.
- 53.- Dreessen WC.  
Health of lead-exposed storage battery workers.  
J. Industr. Hyg. 1943 ; 25 : 60-70.
- 54.- Dufau ML. De Kretzer DM & Hudson B.  
Steroid metabolism by isolated rat seminiferous tubules in tissue culture.  
Endocrinology 1971 ; 88 : 825-832.
- 55.- Dufau ML. Watanabe K & Catt KJ.  
Stimulation of cyclic AMP production by the rat testis during incubation with hCG ( human chorionic gonadotropin ) in vitro.  
Endocrinology 1973 ; 92 : 6-11.
- 56.- Dufau ML. Tsuruhara T. Horner RA. Podesta EJ & Catt KJ.  
Intermediate role of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and protein kinase during gonadotropin-induced steroidogenesis in testicular interstitial cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977 ; 74 : 3419-3423.
- 57.- Erlenmeyer E.  
Z. exp. Path. Ther. 1913 ; 14 : 310-  
citado en Hunter D, 1985.
- 58.- Ewing LL. Wing T-Y. Cochran RC. Kromann N & Zirhin BR.  
Effects of luteinizing hormone on Leydig cell structure and testosterone secretion.  
Endocrinology 1983 ; 112 : 1763-1769.
- 59.- Eyden BP. Maisin JR & Mattelin G.  
Long-term effects of dietary lead acetate on survival, body weight and seminal cytology in mice.  
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1978 ; 19 : 266-272.

60.- Fairhall LT.

Lead studies. VII. The phosphates of lead. Equilibrium in the system lead oxide-phosphoric anhydride-water at 25°C.

J. Amer. chem. Soc. 1924 ; 46 : 1593.

61.- Fairhall LT.

Toxic dusts and fumes.

J. Industr Hyg. 1936 ; 18 : 668-680.

62.- Fairhall LT & Keenan RG.

A rapid method for the microanalysis of lead.

J. Amer. chem. Soc. 1941 ; 63 : 3706-3709.

63.- Fairhall LT.

Industrial Toxicology

Baltimore: Williams Wilkins, 1957.

64.- Felsher BF. Norris ME & Shin JC.

Red-cell uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda and in other forms of porphyria.

N. Eng. J. Med. 1978 ; 299 : 1095-1098.

65.- Garza-Chapa R. Leal-Garza CH & Molina Ballesteros G.

Chromosome analysis in subjects exposed professionally to lead contamination.

Arch. Invest. Med. 1977 ; 8 : 11-20.

66.- Goldsmith JR & Hexter AC.

Respiratory exposure to lead. Epidemiological and experimental dose-response relationships.

Science 1967 ; 158 : 132-134.

67.- Gordon AS. Zanjani ED. Levere RD & Kappas A.

Stimulation of mammalian erythropoiesis by 5β-H esteroides metabolites.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1970 ; 65 : 919-924.

68.- Gower DB.

In " Comprehensive Biochemistry."

ed. Florkin M & Stutz EH.

Amsterdam: Elsevier, 1968.

- 69.- Gower DB. Daly JR. Snodgrass GJAI & Stern MI  
Steroid excretion and biosynthesis with special reference to C<sub>19</sub>- $\Delta$ <sub>16</sub> - steroids in an infant with virilizing adrenocortical carcinoma.  
Acta. Endocr. 1970 ; 63 : 562-576.
- 70.- Gower DB.  
16-Unsaturated C<sub>19</sub> steroids. Review of their chemistry, biochemistry, and possible physiological role.  
J. Steroid. 1972 ; 3 : 45-103.
- 71.- Gower DB & Fotherby K.  
Chap.4. " Biosynthesis of the androgens and oestrogens."  
- Gower DB.  
Chap.5. " Properties and subcellular location of enzymes involved in steroidogenesis.  
In: " Biochemistry of Steroid Hormones."  
ed. Makin HLJ.  
Oxford, London, Edinburg & Melbourne: Blackwell Scientific Publications, 1973.
- 72.- Gower DB.  
Modifiers of steroid-hormone metabolism. Review of their chemistry, biochemistry, and clinical applications.  
J. Steroid. Biochem. 1974 ; 5 : 501-523.
- 73.- Granick S & Kappas A.  
Steroid induction of porphyrin synthesis in liver cell culture.  
J. Biol. Chem. 1967 ; 242 : 4587-4593.
- 74.- Granik S. Sassa S. Granik JL. Levere RD & Kappas A.  
Assays for porphyrins  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase, and porphyrinogen synthetase in microliter samples of whole blood: applications to metabolic defects involving the heme pathways.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1972 ; 69 : 2381-2385.
- 75.- Grunder FI & Moffitt AE.  
Evaluation of Zinc protoporphyrin in occupational environment.  
Am. Ind. Hyg. Assoc. 1979 ; 40 : 686-694.

76.- Gusserow A.

Virchows Arch . 1861 ; 21: 443-

citado en Hunter D. ( 1985 )

77.- Hall PF.

Endocrinology of the testis.

In " The Testis "

ed: AJ. Johnson Gomes ER & NL. Van Demark

New York: Academic Press, 1970.

78.- Hall PF. Charponnier C. Nakamura M & Gabbiani G.

The role of microfilaments in the response of Leydig cells to luteinizing hormone.

J. Steroid. Biochem. 1979 ; 11 : 1361-1366.

79.- Hamilton A.

Industrial poisoning in united States.

New York: Macmillan, 1925.

80.- Hardy HL. Elkins HB. Ruotolo BPW. Quinby J & Baker WH.

Use of monocalcium disodium ethylenediamine tetraacetate in lead poisoning.

J. Amer. Med. Assoc. 1954 ; 154 : 1171-1175.

81.- Heller SR. Labbé RF & Nutter J.

A simplified assay for porphyrins in whole blood.

Clin. Chem. 1971 ; 17 : 525-528.

82.- Heubel E.

Pathogenese und Symptome der chronischen Bleivergiftung. Berlin 1871.

citado en Hunter D, 1985.

83.- Hildebrand BC. Der R. Griffin WT & Fahim MS.

Effects of lead acetate on reproduction.

Am. J. Obstet. Gynecol. 1973 ; 115 : 1058-1065.

84.- Hoffman DJ & Nigoyi SK.

Metal mutagens and carcinogens affect RNA synthesis rates in a distinct manner.

Science 1977 ; 198 : 513-514.

85.- Hogan GR.

Single lead acetate insult, testosterone therapy, and erythropoiesis in mice.

J. Toxicol. Environ. Health. 1973 ; 33 : 577-588.

86.- Hornos JI.

Ciclo biológico del plomo en el ambiente y en el organismo humano sobreexposto.

Medicina de Empresa 1980 ; XIV : 8-16.

87.- Hunter D & Aub JC.

Lead studies. XV. The effect of the parathyroid hormone on the excretion of lead and calcium in patients suffering from lead poisoning.

Quart. J. Med. 1927 ; 20: 123-140.

88.- Hunter D.

Enfermedades Laborales.

Barcelona : Jims, 1985.

89.- Hussey HM.

Editorial: Lead poisoning and fecundity in Men.

Jama 1975 ; 233 : 816-817.

90.- Inano H. Inano A & Tamaoki B.

Studies on enzyme reactions related to steroid biosynthesis.II. Submicrosomal distribution of the enzymes related to androgen production from pregnenolone and of the cytochrome P-450 in testicular gland of rat.

J. Steroid Biochem. 1970 ; 1 : 83-91.

91.- Ishimaru T. Pages L & Horton M.

Altered metabolism of androgens in elderly men with benign prostatic hyperplasia.

J. Clin. Endocr. Metab. 1977 ; 45 : 695-702.

92.- Jacquet P.

Effects of lead given during gestation to mice.

C. R. Soc. Biol. 1976 ; V : 1319-1322.

93.- Jacquet P. Gerber GB. Leonard A & Maes J.

Plasma hormone levels in normal and lead-treated pregnant mice.

Experientia 1977 ; 33 : 1375-1376.



94.- Johansson L & Wide M.

Long-Term Exposure of the male mouse to lead: Effects on fertility.

Environ. Research. 1986 ; 41: 481-487.

95.- Joselow M & Flores J.

Application of the Zinc-Protoporphyrin ( ZP ) as a monitor of occupational exposure to lead.

Am. J. Ind Hyg. Assoc. 1977 ; 38 : 63-66.

96.- Kajimoto M. Kondo M. Niwa M. Susuki T. Kimura H. Sasaki A & Urata G.

Increase of  $\delta$ - aminolevulinic acid dehydratase ( ALA-D ) in rat erythrocytes in lead poisoning.

Arch. Toxicol. 1983 ; 52 : 1-11.

97.- Karacic V. Prpic-Majic & Telisman S.

The relationship between zinc protoporphyrin ( ZPP ) and " Free " erythrocyte protoporphyrin ( FEP ) in lead-exposed individuals.

Int. Arch. Occup Environ Health 1980 ; 47 : 165-177.

98.- Karhausen L.

Intestinal lead absorption .

In " Proceedings of the International Symposium on Environmental Health. " Aspects of lead.

Luxemburg : Commission of the European Communities, 1973.

99.- Katagiri M. Takemori S. Itageki E. Suhara K. Gomi T & Sato R.

Characterization of purified cytochrome P-45011 $\beta$  from bovine adrenal mitochondria.

Adv. Exp. Med. Biol. 1976 ; 74 : 281-

100.- Kellie AE.

Structure and Nomenclature.

In " Biochemistry of Steroid Hormones. " Ed. Makin HLJ.

Oxford, London, Edinburgh & Melbourne : Blackwell Scientific Publications ,1973.

101.- Kendall RJ. Veit HP & SScanlon PF.

Histological effects and lead concentrations in tissues of adult male ringed turtle doves that ingested lead shot.

J. Toxicol. Environ. Health. 1981 ; 8 : 649-658.

- 102.- Kench JE. Gillam AE & Lane RE.  
Hemopoiesis in lead poisoning.  
Biochem. J. 1942 ; 36 : 384-388.
- 103.- Kety SS & Letonoff TV.  
The treatment of lead poisoning by sodium citrate.  
Amer. Journ. Med. Sci. 1943 ; 205 : 406-414.
- 104.- Key JA.  
Lead studies. IV. Blood changes in lead poisoning in rabbits, with special reference to the stippled cells.  
Amer. J. Physiol. 1924 ; 70 : 86-97.
- 105.- Khare N. Der R. Ross G & Fahim M.  
Prostatic celular changes after injection of cadmium and lead in to rat prostate.  
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1978 ; 20 : 351-365.
- 106.- Kimura T.  
ACTH stimulation of cholesterol side chain cleavage activity of adrenocortical mitochondria.  
Mol. Cell. Biochem. 1981 ; 35 : 105-122.
- 107.- Kishi R. Ikeda T. Miyake H. Uchino E. Suzuki T & Inone K.  
Effects of low lead exposure on neuro behavioral function in the rat.  
Arch. Environ. Health 1983 ; 38 : 25-33.
- 108.- Knelson JH. Johson RJ. Coolston F. Goldberg L & Griffin T.  
Kinetics of respiratory lead uptake in humans.  
In: " Proceedings of the International Symposium on Environmental Health Aspects of Lead."  
Luxemburg : Commisssion of the European Communities, 1973.
- 109.- Koga N. Hirai Y. Hasegawa T & Tomokuni K.  
Studies on the inhibition of erythrocyte and hepatic  $\delta$  aminolevulinic acid dehydratase activities and its restoration in mice exposed to lead.  
Ind. Health 1984 ; 22 : 83-90.
- 110.- Kondo M. Kajimoto M & Urata G.  
Alteration of activities of  $\delta$ - aminolevulinic acid dehydratase and  $\delta$ - aminolevulinic acid dehydratase inhibitor in the bone marrov cells of lead poisoned rats.  
Exp. Hematol. 1983 ; 11 : 324-331.

- 111.- Kostial K. Simonovic I & Pisonic M.  
Lead Absorption from the intestine in newborn rats.  
Nature. 1971 ; 233 : 564-570
- 112.- Kushner JP. Barbuto AJ & Lee GR.  
An inherited enzymatic defect in Porphyria cutanea tarda.  
J. Clin. Invest. 1976 ; 58 : 1089-1097.
- 113.- Laatikainen T. Laitinen EA & Vihko R.  
Secretion of free and sulfate-conjugated neutral steroids by human testis. Effect of administration of human chorionic gonadotropins.  
J. Clin. Endocr. Metab. 1971 ; 32 : 59-64.
- 114.- Lacranjan I. Popescu HI. Gavanescu O. Klepsch & Serbanescu M.  
Reproductive ability of workmen occupationally exposed to lead.  
Arch. Environ. Health. 1975 ; 30 : 396-401.
- 115.- Lamola AA & Yamane T.  
Zinc protoporphyrin in erythrocytes of patients with lead intoxication and iron deficiency anemia.  
Science 1974 ; 186 : 936-938.
- 116.- Lamola AA. Joselow M & Yamane T.  
Zinc Protoporphyrin ( ZPP ): a simple, sensitive, fluorimetric screening test for lead poisoning.  
Clin. Chem. 1975 ; 21 : 93-97.
- 117.- Lamola AA. Eisinger J. Blumberg WE. Kometani T & Burnham BF.  
Quantitative determination of erythrocyte zinc protoporphyrin.  
J. Lab. Clin. Med. 1977 ; 89 : 881-890.
- 118.- Lamola AA. Eisinger J & Blumberg WE.  
Erythrocyte protoporphyrin/heme ratio by hematofluorometry.  
Clin. Chem. 1980 ; 26 : 677-678.
- 119.- Landrigan PJ. Gehlbach SH. Rosenblun BF. Shouts JM. Candelaria RM. Barthel WF. Liddle JA. Smrek AL. Staehling NW & Sanders JF.  
Epidemic lead absorption near an ore smelter.  
N. Engl. J. Med. 1975 ; 292 :123-

- 120.- Landrigan PJ. Baloh RW. Barthel WF. Whitworth RH. Staehling NW & Rosenblum BF.  
Neurophysiological dysfunction in children with chronic low-level lead absorption  
Lancet 1975 ; I : 708-712.
- 121.- Lane RE.  
J.Industr. Hyg. 1934 ; 13 : 276-  
citado en Hunter D, 1985.
- 122.- Lane RE.  
The care of the lead worker.  
Brit. J. Industr. Med. 1949 ; 6 : 125-143.
- 123.- Legge Sir T & Goadby KW.  
Lead Poisoning and Lead Absorption.  
London: Arnold, 1912.
- 124.- Legge Sir T.  
Industrial maladies  
London : Oxford University Press, 1934 .
- 125.- Lehninger AL.  
Bioquímica.  
Barcelona : Omega, 1982.
- 126.- Lipsett MB. Wilson H. Kirschner MA. Korenman SJ. Fishman LM. Sarfaty GA  
& Bardin CW.  
Studies on Leydig cell physiology and pathology - Secretion and metabolism of  
testosterone.  
Rec. Prog. Horm. Res. 1966 ; 22 : 245-256.
- 127.- Longcope C.  
The effect of human chorionic gonadotropin on plasma steroid levels in young and  
old men.  
Steroids 1973 ; 21 : 583-588.
- 128.- Mac Lean R. Calhoun JA & Aub JC.  
Migration of inorganic salts in bone as measured by radioactive lead and by  
alizarin.  
Arch. Industr. Hyg. Occup. Med. 1954 ; 9 : 113-121.

1291.- Mahoudeau JA. Bardin CW & Lipsett MB.

The metabolic clearance rate and origin of plasma dihydrotestosterone in man and its conversion to the 5 alfa androstendiols.

J. Clin. Invest. 1971 ; 50 : 1338-1347.

130.- Maloof CC.

Role of porphyrins in occupational diseases. I. Significance of coproporphyrinuria in lead workers.

Arch. Industr. Hyg. Occup. Med. 1950 ; 1 : 296-307.

131.- Matteson KJ. Chug B. Urdea MS & Miller WL.

Characterization of cholesterol side-chain cleavage ( 20,22 desmolase ) deficiency causing congenital lipid adrenal Hyperplasia using bovine sequence P-450scc oligodeoxyribonucleotide probes.

Endocrinology 1986 ; 118 : 1296-1307.

132.- Méranger JC. Hollebome BR & Blanchette GA.

The effects of storage times, temperatures and container types on the accuracy of atomic absorption determination of Cd, Cu, Hg, Pb and Zn in whole heparinized blood.

J. Anal. Toxicol. 1981 ; 5 : 33-41.

133.- Mercier C. Alfsen A & Baulieu EE.

A testosterone binding globulin

In: " Androgens in normal and Pathological conditions " ed. Vermeulen & Exley D.

EMF- Intern. Congress Series ; 1966 ; 101 : 212-219.

134.- Mercier C. Marchut M. Perrot M. Picard MT. Baulieu EE & Robel P.

Influence of purified plasma proteins on testosterone uptake and metabolism by normal and hyperplastic human prostate in constant flow organ.

J. Clin. Endocr. Metab. 1976 ; 43 : 374-386.

135.- Minot AS & Aub JC.

Lead studies. V. Distribution of lead in the human organism.

J. Industr. Hyg. 1924 ; 6 : 149-158.



136.- Michaelson IA & Bradbury M.

Effect of early inorganic lead exposure on rat blood brain barrier permeability to tyrosine or choline.

Biochem. Pharmacol. 1982 ; 31 : 1881-1885.

137.- Mirand EA. Gordon AS & Wenig J.

Mechanism of testosterone action in erythropoiesis.

Nature 1965 ; 206 : 270-272.

138.- Mitjavila V.

Noticia de los daños que causan al cuerpo humano. las preparaciones del plomo ya administradas como medicina, ya mezcladas fraudulentamente con los alimentos de primera necesidad. Se da un medio facil, é inteligible a toda clase de gentes, para saber si el vino, pan & c. estan adulterados con plomo.

Ed. Manuel Texero. 1791.

Barcelona : Edicions i Publicacions de la Universitat de Barcelona, 1983.

139.- Mock EJ & Frankel AI.

A shifting circannual rhythm in serum testosterone concentration in male laboratory rats.

Biol. Repro. 1978 ; 19 : 927-930.

140.- Momcilovic B & Kostial K.

Kinetics of lead retention and distribution in suckling and adult rats.

Environ. Res. 1974 : 8 : 214-220.

141.- Moore Mr. Meredith PA & Goldberg A.

Lead and Heme Biosynthesis.

In: " Lead Toxicity "

Ed: Radhey L. Singhal & John A. Thomas.

Baltimore & Munich : Urban Schwarzenberg Inc, 1980.

142.- Morris HP. Lang EP & Morris HI.

The growth and reproduction of rats fed with diets containing lead acetate and arsenic trioxide and the lead arsenic content of new born and adult suckling rats.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 1938 ; 64 : 420-425.

143.- Naets JP & Wittek M.

Mechanism of action of androgens on erythropoiesis.

Am. J. Physiol. 1966 ; 210 : 315-320.

- 144.- Nakajin S. Shinoda M. Haniu M. Shively JE & Hall PF.  
C<sub>21</sub> steroid side chain cleavage enzyme from porcine adrenal microsomes.  
Purification and characterization of the 17 alfa- hidroxilase / C 17-20 liase citochrome  
P-450.  
J. Biol. Chem. 1984 ; 259 : 3971-3976.
- 145.- Natusch DFS & Wallace JR.  
Urban aerosol toxicity. The influence of particle size.  
Science 1974 ; 186 : 695-699.
- 146.- Needleman HL.  
" Lead poisoning in children " Neurologic implications of widespread subclinical  
intoxication.  
Sem. Psych. 1973 ; 5 : 47-54.
- 147.- Nieuwenhuijsen K. de Neef KJ. van de Werff JJ & Slob AK.  
Testosterone, testis size, seasonality, and behavior in group living stump-tail  
macaques ( *Macaca arctoides* )  
Hormones and Behavior 1987 ; 21 : 153-169.
- 148.- Nordenson I. Beckman G. Backman L & Nordstrom S.  
Occupational and environmental risk in and around a smelter in northern Sweden  
IV. Chromosomal aberrations in workers exposed to lead.  
Hereditas 1978 ; 88 : 263-268.
- 149.- Nordenson I. Nordstrom S. Sweins A & Beckman L.  
Chromosomal aberrations in lead-exposed workers.  
Hereditas 1982 ; 96 : 265-268.
- 150.- Nordmann Y & Devars du Mayne JF.  
Dépistage du saturnisme chronique . " Interet du dosage de la protoporphyrine  
erythrocytaire. "  
Press. Méd. 1984 ; 13 : 2137-2141.
- 151.-Northcutt RC. Island DP & Liddle GW.  
An explanation for the target organ unresponsiveness to testosterone in the  
testicular feminization syndrome.  
J.Clin. Endocr. Metab. 1969 ; 29 : 422-425.

- 152.- Odell WD. Ross GT & Rayford R.  
Radioimmunoassay for Luteinizing hormone in human plasma or serum:  
physiological studies.  
J. Clin. Invest. 1967 ; 46 : 248-255.
- 153.- Odell WD. Parlow AF. Cargille DM & Ross GT.  
Radioimmunoassay for human follicle-stimulating hormone : physiological studies.  
J. Clin. Invest. 1968 ; 47 : 2551-2562.
- 154.- Odell WD. Swerdloff RS. Bain S. Wollesen F & Gower PK.  
The effect of sexual maturation of the testicular response to LH stimulation of  
testosterone secretion the intact rat.  
Endocrinology 1974 ; 95 : 1380-1384.
- 155.- Oliver Sir T.  
Lead Poisoning  
London : HK Lewis, 1914.
- 156.- O'Riordan ML & Evans HJ.  
Absence of significant chromosome damage in males occupationally exposed to  
lead.  
Nature 1974 ; 247 : 50-53.
- 157.- Osheroff MR. Uno H & Bowman E.  
Lead inclusion bodies in the anterior horn cells and neurons of the substantia  
nigra in the adult rhesus monkey.  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 1982 ; 64 : 570-576.
- 158.- Otto DA. Benignus VA. Muller KE & Barton CN.  
Effect of age and body lead burden on CNS function in young children. I slow  
cortical potentials.  
Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 1981 ; 52 : 229-239.
- 159.- Patterson CC.  
Contaminated and natural lead environments of man.  
Arch. Environ. Health. 1965 ; 11 : 344-360.



- 160.- Payne AH. Quinn PG & Rani CSS.  
Regulation of Microsomal Cytochrome P-450 Enzymes and Testosterone Production in Leydig Cells.  
Rec. Prog. Horm. Res. 1985 ; 41 : 153-197.
- 161.- Pearlam A & Crepy O.  
Steroid protein interaction with particular reference to testosterone binding by human serum.  
J. Biol. Chem. 1967 ; 242 : 182-187.
- 162.- Perez de la Ossa R.  
El papel de la ZPP en la detección y diagnóstico del Saturnismo. Documentos técnicos.  
Madrid :Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 1983.  
Rev. Diag. Biol. 1982 ; 31 : 165-171.
- 163.- Petrusz P. Weaver CM. Grant LD. Mushak P & Krivan M.  
Lead poisoning and reproduction : Effects on pituitary and serum gonadotropins in neonatal rats.  
Environ. Research. 1979 ; 19 : 383-391.
- 164.- Phillips JC. Foster PMP & Gangolli SP.  
Chemically-induced injury to the male reproductive tract.  
In: " Endocrine toxicology " ed. JA.Thomas. KS. Korach & JA.Lachlan.  
Target organ toxicology series.  
New York : Raven Press, 1983.
- 165.- Pinta M.  
Spectrométrie d'absorption atomique. Vol I y II  
Paris, New York, Barcelona & Milan : Masson, 1980.
- 166.- Piomelli S.  
A micromethod for free erythrocyte porphyrins : the FEP test.  
J. Lab. Clin. Med. 1973 ; 81 : 932-940.
- 167.- Plechaty MM. Noll B & Sunderman FW Jr.  
Lead concentrations in semen of healthy men without occupational exposure to lead.  
Ann. Clin. Lab. Sci. 1977 ; 7 : 515-518.

- 168.- Puhac I. Hrgocic N. Stankovic & Popvic S.  
Laboratory investigation on the possibility of employing lead compounds as raticides by decreasing the reproductive capacity of rats.  
Acta Veterin. 1963 ; 13 : 3-9.
- 169.- Quinche J. Zuber P & Bovay E.  
Les depots de plomb provenant des gaz d'échappement des vehicules automobiles le long des routes a forte densité de circulation.  
Phytopath. Z. 1969 ; 66 : 259-264.
- 170.- Rabinowitz MB. Wetherill GW & Kopple JD.  
Lead metabolism in the normal human. Stable isotope studies.  
Science 1973 ; 182 : 725-727.
- 171.- Ramazzini B.  
" De morbis artificum diatriba " Padua 1700.  
traducido por W.C. Wright.  
Chicago : University of Chicago Press, 1940.
- 172.- Roels HA. Balis JMN. Buchet JP & Lauwerys RR.  
The influence of sex and chelation therapy on erythrocyte protoporphyrin and urinary  $\delta$ -aminolevulinic acid in lead exposed workers.  
J. Occup. Med. 1979 ; 21 : 527-539.
- 173.- Rosenfield RL.  
Plasma testosterone binding globulin and indexes of the concentration of unbound plasma androgens in normal and hirsute subjects.  
J. Clin. Endocr. Metab. 1971 ; 32 : 717-728.
- 174.- Rustagi JS.  
Mathematical models of body burden.  
Arch. Environ. Health. 1965 ; 10 : 761-767.
- 175.- Sandstead HH. Orth DN. Abe K & Stiel J.  
Lead intoxication: effect on pituitary and adrenal function in man  
Clin. Research. 1970 ; 18 : 76-83.
- 176.- Sarto F. Stella M & Acqua A.  
Cytogenetic studies in 20 workers occupationally exposed to lead.  
Med. Lav. 1978 ; 69 : 172-180.

- 177.- Sassa S. Granick JL. Granick S. Kappas A & Iverie RD.  
Studies in lead poisoning. I microanalysis of erythrocyte protoporphyrin levels by spectrofluometry in the detection of chronic lead intoxication in the subclinical range.  
Biochem.Med. 1973 ; 8 : 135-148.
- 178.-Saxena DK. Lal B & Morthy RC.  
Lead induced histochemical changes in the testes of rats.  
Ind. Health 1984 ; 22 : 255-260.
- 179.- Schein L. Donovan MP & Thomas JA.  
Characterization of cytoplasmic binding of dihydrotestosterone by the prostate gland, seminal vesicles, kidney and liver of the mouse.  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 1978 ; 44 : 147-153.
- 180.- Schroeder HA & Tipton IH.  
The human body burden of lead .  
Arch. Environ. Health. 1986 ; 17 : 965-978.
- 181.- Semillas J.  
Metil-Terbutil-Eter, proximo substituto del plomo tetraetilo como mejorador del índice de octano de las gasolinas.  
Medicina de Empresa 1986 ; 20 : 27-29.
- 182.- Silbergeld EK.  
Experimental studies of lead neurotoxicity : implications for mechanism, dose-response and reversibility.  
In: " Lead Versus Health "  
ed. M.Rutter & RE Jones.  
London : Jhon Wiley & Sons, Ltd, 1983
- 183.- Simier R. Chabert G.  
Intéret du dosage de la protoporphyrine-zinc dans le despistage précoce du saturnisme . " Notre experience dans une usine d'acculateurs."  
Arch. Mal. Prof. 1983 ; 44 : 167-172.

184.- Simpson ER.

Cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P-450, and the control of steroidogenesis.

Mol. Cell. Endocrinol. 1979 ; 118 : 1296-1305.

185.- Singhal R. Vijayvargiya R & Shukla GS.

Toxic effects of cadmium and lead on reproductive functions.

In: " Endocrine toxicology "

ed: JA.Thomas ,K.S. Korach & JA. Lachlan

Target organ toxicology series.

New York : Raven Press, 1983.

186.- Smith CG.

Reproductive Toxicity: Hypothalamic-pituitary mechanisms.

Amer. J. Industr. Med. 1983 ; 4 : 107-112.

187.- Sokol RZ. Madding CE & Swerdloff RS.

Lead toxicity and the hypothalamic-pituitary-testicular axis.

Biology of Reproduction 1985 ; 33 : 722-728.

188.- Steinberger E & Steinberger A.

Hormonal control of testicular function in mammals.

In: " Handbook of Physiology ". Vol 4.

ed. K Knobil & WH Sawyer.

Washington DC : American Physiological Society, 1974.

189.- Sterling GH. O'Neill KJ. Mc Cafferty & o'Neill JJ.

Effects of chronic lead ingestion by rats on glucose metabolism and acetylcholine synthesis in cerebral cortex slices.

J. Neurochem. 1982 ; 39 : 592-596.

190.- Stowe HD & Goyer RA.

The reproductive ability and progeny of F1 lead-toxic rats.

Fert. Steril. 1971 ; 22 : 755-760.

191.- Stuik EJ.

Biological response of male and female volunteers to inorganic lead.

Int. Arch. Arbeitsmed. 1974 ; 33 : 83-97.

- 192.- Stumpf WE. Sar M & Grant LD.  
Autoradiographic localization of  $^{210}\text{Pb}$  and its decay products in rat forebrain.  
Neurotoxicology 1980 ; 1 : 593-606.
- 193.- Tanquerel des Planches L.  
Traité des maladies de plomb, ou saturnines.  
Paris : Ferra, 1839.
- 194.- Teisinger J. Xintaras C & Pfitzer E.  
Prague international lead panel. Effects of atmospheric lead on biological systems.  
Science 1973 ; 179 : 197-198.
- 195.- Teleky L.  
A note on blood pressure in lead poisoning.  
J. Industr. Hyg. Toxic. 1937 ; 19 : 1-5
- 196.- Thomas HV. Milmore BK. Heidbreder GA & Kogan BA.  
Blood lead of persons living near free ways.  
Arch. Environ. Health. 1967 ; 15 : 695-702.
- 197.- Thomas JA. Donovan MP. Waalkes MP & Curto KA.  
Interactions between protein and heavy metals in the rodent prostatic cell.  
In " The prostatic cell : Structure and function. ", Part A.  
Alan R. Liss, 1981. New York
- 198.- Thomas JA & Brogan WC.  
Some actions of lead on the Sperm and on the male reproductive system.  
Am. J. Industr. Med. 1983 ; 4 : 127-134.
- 199.- Thomas H J.  
The Porphyrias : Recent advances.  
Clin. Chem. 1986 ; 32 : 1255-1263.
- 200.- Valor BA. Kimmel CA. Woods JS. Mc Connell EE & Grant LD.  
Chronic low level lead toxicity in the rat III. An integrated assesment of long-term toxicity an especial references to the kidney.  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 1980 ; 56 : 59-64.

- 201.- Van de Vusse GJ. Kalkman ML & Van der Molen HJ.  
Endogenous steroid production in cellular and subcellular fractions of rat testis after prolonged treatment with gonadotropins.  
Biochim. Biophys. Acta. 1975 ; 380 : 473-485.
- 202.- Varma MM. Joshi SR & Adeyemi AO.  
Mutagenicity and infertility following administration of lead subacetate to Swiss male mice.  
Experientia 1974 ; 30 : 486-487.
- 203.- Varon HH. Touchstone JC & Christian JJ.  
Biological conditions modifying quantity of 17-hydroxy corticoids in mouse adrenal.  
Acta Endocr. 1966 ; 51 : 488-496.
- 204.- Vermande-Van Eck GJ & Meigs JW.  
Changes in the ovary of the rhesus monkey after chronic lead intoxication.  
Fert. Steril. 1960 ; 11 : 223-234.
- 205.- Vermeulen A. Stoica T & Verdonk L.  
Apparent free testosterone concentration, an index of androgenicity.  
J. Clin. Endocr. Metab. 1971 ; 33 : 759-766.
- 206.- Vermeulen A. Stoica T. Van der Stratten M & Oric M.  
Capacity of the testosterone binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance.  
J. Clin. Endocr. Metab. 1969 ; 29 : 1470-1480.
- 207.- Vermeulen A & Ando S.  
Metabolic clearance rate and interconversion of androgens and the influence of the androgen fraction.  
J. Clin. Endocr. Metab. 1979 ; 48 : 320-326.
- 208.- Vermeulen A.  
Les androgènes circulants.  
In: " Les Androgènes "  
Collection Colloque d'Endocrinologie.  
Paris : Masson, 1979.

209.- Vigdortchik NA.

Lead intoxication in the etiology of hypertonia.

J. Industr. Hyg. 1935 ; 17: 1-6.

210.- Vivian SR & La Bella FS.

Classic bioassay statistical procedures applied to radioimmunoassay of bovine thyrotropin, growth hormone and prolactine.

J. Clin. Endocrinol. Metabol. 1971 ; 33 : 225-233.

211.- Waldron HA & Stofen D.

Subclinical lead poisoning

London : Academic Press, 1974.

212.- Waldron HA.

Proceedings of the 23 rd Congres of the History of Medicine.

London : Welcome Institute, 1974.

213.- Weller CV.

The blastophthric effects of chronic lead poisoning.

J. Med. Res. 1915 ; 33 : 271-293.

214.- Wessel MA & Dominski A.

Our children's daily lead.

Amer. Sci. 1977 ; 65 : 294-298.

215.- Wibowo AAE & Zielhius RL.

Diferent effects on hemesynthesis in male and female rabbits treated with lead acetate.

Arch. Toxicol. 1980 ; 45 : 67-73.

216.- Wibowo AAE & Zielhius RL.

The effet of testosterone administration on lead induced zincprotophyrin in blood concentration in castrated male rabbits.

Arch. Toxicol. 1981 ; 49 : 65-71.

217.- Wiebe JP. Tilbe KS & Buckingham K.

An analysis of the metabolites of progesterone produced by isolated sertoli cells at the onset gametogenesis.

Steroids 1980 ; 35 : 561-577.

218.- Wiebe JP. Salhanick AI & Myers KI.

The mechanism of action of lead in the testes: in vitro suppression of LH receptor, cyclic AMP and steroidogenesis.

Life Sci. 1983 ; 32 : 1977-1986.

219.- Willes RF. Lok E. Truelove JF & Sundaram A.

Retention and tissue distribution of  $^{210}\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , administered orally to infant and adult monkeys.

J. Toxicol. Environ. Health. 1979 ; 3 : 395-406.

220.- Ximenes L.

Espectroscopia de absorción atómica Vol I y II

Madrid : Publicaciones analíticas, 1982.

221.- Yanahara T & Troen P.

Studies of the human testis I. Biosynthetic pathways for androgen formation in human testicular tissue in vitro.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 1972 ; 34 : 783-792.