

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

EXPOSICION MANTENIDA A BAJAS DOSIS DE PLOMO.
UN MODELO EXPERIMENTAL

TESIS DOCTORAL
M^a ROSA VILLANUEVA ORBAIZ
MADRID, Noviembre de 1993



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Medicina Preventiva y Salud Pública

D. MANUEL DOMINGUEZ CARMONA, Catedrático Emérito y DÑA. MARGARITA ROMERO MARTIN, ambos del Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública e Hª de la Ciencia, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

HACEN CONSTAR: Que DÑA. Mª ROSA RITA VILLANUEVA ORBAIZ ha realizado su Tesis Doctoral titulada "EXPOSICION MANTENIDA A BAJAS DOSIS DE PLOMO. MODELO EXPERIMENTAL", bajo nuestra dirección.

Y para que así conste lo firmamos en Madrid, a día uno de Diciembre de mil novecientos noventa y tres.

Fdo.: M. Domínguez Carmona

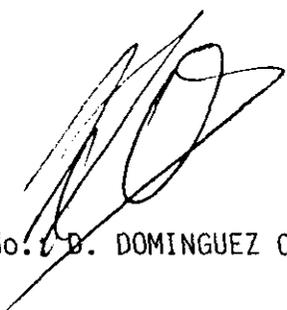
M. Romero Martín

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

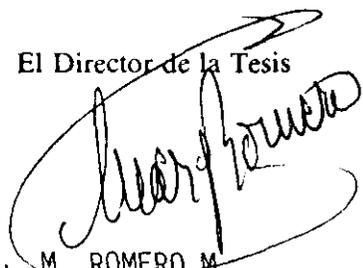
La Memoria Académica que lleva por título "EXPOSICION MANTENIDA A BAJAS DOSIS DE PLOMO. UN MODELO EXPERIMENTAL" presentada por D^a MARIA ROSA RITA VILLANUEVA ORBAIZ, para la obtención del Título Académico de Doctor en Medicina y Cirugía, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública e Historia de la Ciencia.

El mencionado trabajo cumple los requisitos del método científico y sus contenidos son adecuados a los objetivos previstos.

V.º B.º
EL TUTOR (2)


Fdo. D. DOMINGUEZ C.

El Director de la Tesis


Fdo. M. ROMERO M.
(fecha y firma)

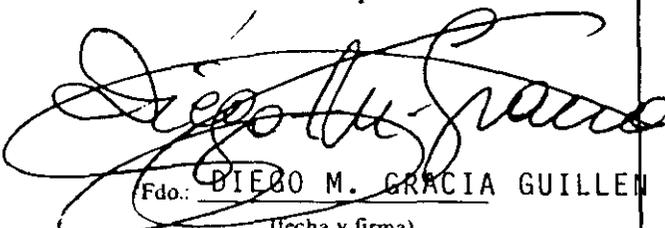
INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

Reunida la Comisión de Doctorado del Departamento de MEDICINA PREVENTIVA, SALUD PUBLICA E HISTORIA DE LA CIENCIA, y una vez examinados la metodología y contenidos del trabajo de investigación realizado por D^a MARIA ROSA RITA VILLANUEVA ORBAIZ, acuerda admitir a trámite dicho trabajo.

Fecha reunión
Consejo Departamento

29 de Noviembre de 1993

El Director del Departamento


Fdo. DIEGO M. GRACIA GUILLEN
(fecha y firma)

A Miguel y Pedro

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A mis directores, Prof. Dr. D. Manuel Domínguez Carmona y Prof^a. Dra. Dña. Margarita Romero Martín.

Al Prof. Dr. D. Vicente Domínguez Rojas, por sus consejos y por la ayuda que me ha concedido en la realización de este trabajo.

A las Prof. Dras. Dña. Paloma Ortega Molina, y Dña. Paloma Astasio Arbiza, por su cariñosa, desinteresada y constante colaboración en la elaboración de esta Memoria.

A la Dra. Dña. Romana Albaladejo Vicente y a Dña. Belén Granados y Arroyo, por su amistosa cooperación y su interés.

Al Dr. D. Miguel Arroyo del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Al Prof. Asociado Dr. D. José Rodríguez Zazo, a D. Juan Galán Torres y a todo el Servicio de Microbiología y Análisis Clínicos del Centro Militar de Veterinaria de Madrid, por su acogida y por permitirme el acceso a sus instalaciones, sin los cuales este trabajo nunca hubiera llegado a buen fin.

A la Dra. Dña. Raquel Tarazona y Lafarga, por su continuo estímulo y por su amistad.

A mi familia, de la que en todo momento he recibido apoyo.

A todos los que de alguna manera han colaborado en esta tesis.

Finalmente, quiero agradecer al Servicio de Investigación y Relaciones Internacionales de la Universidad Complutense la concesión de una Beca-Complutense Predoctoral en España.

INDICE

I.	INTRODUCCION.....	1
	1. Propiedades fisicoquímicas del plomo.....	2
	2. Fuentes de exposición al plomo.....	3
	2.1. Exposición de la población general.....	3
	2.2. Exposición de lactantes y niños.....	5
	2.3. Exposición laboral.....	6
	2.4. Factores que influyen en la toxicidad del plomo.....	7
	3. La fisiopatología.....	8
	3.1. Metabolismo.....	8
	3.2. Patología.....	10
	3.3. Plomo y carcinogénesis.....	14
	4. Plomo e inmunidad.....	15
	4.1. Cambios en la receptividad a diversos agentes bacteriano, virales y neoplásicos.....	15
	4.2. Plomo e inmunidad humoral y celular.....	17
	4.3. Plomo, granulocitos y macrófagos.....	18
	5. Diagnóstico del saturnismo.....	20
	5.1. Marcadores de dosis interna.....	20
	5.2. Marcadores del efecto biológico.....	21
	6. Tratamiento y control de la exposición plúmbica..	23
	7. Prevención del saturnismo.....	24
	7.1. Prevención primaria.....	24
	7.2. Prevención secundaria.....	24
II.	OBJETIVOS.....	26
III.	MATERIAL Y METODOS.....	28
	1. Animales de laboratorio.....	29
	1.1. Condiciones de mantenimiento de los ratones.	29
	1.2. Exposición al plomo.....	30
	1.3. Vigilancia de los ratones durante la exposi- ción.....	30
	2. Determinación del plomo renal.....	31
	2.1. Material de estudio.....	31
	2.2. Reactivos.....	32
	2.3. Material de trabajo.....	32

2.4. Procedimiento.....	32
3. Obtención y recuento de las células peritoneales residentes.....	34
3.1. Material.	34
3.2. Procedimiento de obtención.....	35
3.3. Recuento del número de células peritoneales.	35
4. Medida de la viabilidad de la membrana celular... ..	36
4.1. Material.....	36
4.2. Procedimiento.....	36
5. Purificación de la células peritoneales.....	37
5.1. Purificación de hematíes.....	37
5.2. Obtención de una población peritoneal rica en macrófagos.....	37
6. Determinación de la composición celular.....	39
6.1. Preparación de las muestras.....	39
6.2. Tinción con la técnica de MayGrunwaldGiemsa.	39
7. Estudio de la adherencia de las células.....	40
7.1. Material.....	40
7.2. Preparación del medio de mantenimiento.....	41
7.3. Procedimiento.....	41
8. Estudio de la quimiotaxis y movilidad espontánea.	42
8.1. Material.....	43
8.2. Procedimiento de siliconizado.....	43
8.3. Preparación del medio de mantenimiento.....	44
8.4. Preparación de la sustancia quimiotáctica... ..	44
8.5. Procedimiento de la quimiotaxis.....	45
8.6. Procedimiento de la movilidad espontánea....	45
9. Estudio de la opsonización, fagocitosis y poder candidicida.....	46
9.1. Material.....	46
9.2. Preparación del medio de mantenimiento.....	47
9.3. Preparación del medio para opsonización de <u>Candida albicans</u>	47
9.4. Preparación de la cepa de <u>Candida albicans</u> ..	48
10. Tratamiento estadístico de los datos.....	49
IV. RESULTADOS.....	51
1. Estandarización de las técnicas.....	52
1.1. Estudio de la validez de la exposición al plomo a través de la bebida.....	52

1.2.	Resultados del seguimiento de los ratones durante el estudio piloto.....	52
1.3.	Estandarización de la obtención de las células peritoneales.....	53
1.4.	Estandarización de la recuperación de las células peritoneales adheridas.....	54
1.5.	Estandarización de la diferenciación celular peritoneal.....	55
1.6.	Estandarización del Índice de adherencia de las células peritoneales.....	55
1.7.	Estandarización de la quimiotaxis y movilidad espontánea.....	56
1.8.	Estandarización de la opsonización, fagocitosis y poder candidicida.....	57
2.	Modelo murino de exposición al plomo.....	58
2.1.	Parámetros generales del buen estado de los animales.....	59
2.2.	Plomo renal.....	60
2.3.	Cuadro hemático.....	61
2.4.	Número de células peritoneales.....	63
2.5.	Viabilidad celular.....	63
2.6.	Composición celular.....	63
2.7.	Índice de la adherencia celular.....	64
2.8.	Parámetros generales.....	65
2.9.	Índice quimiotáctico.....	65
2.10.	Índice de movilidad espontánea.....	67
2.11.	Parámetros generales.....	67
2.12.	Índice fagocítico y número medio de <u>Candidas</u> por macrófago.....	68
2.13.	Número de macrófagos con <u>C. albicans</u> adheridas.....	69
2.14.	Índice candidicida.....	69
V.	DISCUSION.....	92
1.	Valoración del modelo de intoxicación.....	93
1.1.	Validez de la administración de acetato de plomo, <u>per os</u> , a través de la bebida.....	93
1.2.	Valoración del buen estado de salud de los animales.....	94

2. Estandarización de las técnicas.....	95
2.1. Obtención de las células peritoneales.....	95
2.2. Adherencia como método de separación.....	96
2.3. Estudio de la composición celular.....	97
2.4. Adherencia.....	98
2.5. Estandarización de la quimiotaxis y la movilidad espontánea.....	99
2.6. Estandarización de la opsonización y fagoci- tosis de <u>Candida</u> y del poder candidicida.....	101
3. Exposición al plomo y riñón.....	103
4. Exposición al plomo y recuento de hematíes.....	105
5. Exposición al plomo y serie blanca.....	105
6. Plomo, número y recuento de células peritoneales.	107
7. Efecto del plomo sobre la viabilidad celular.....	110
8. Índice de adherencia.....	111
9. Índices de quimiotaxis y movilidad espontánea....	114
10. Adherencia de <u>C. albicans</u> , fagocitosis y poder candidicida.....	118
VI. CONCLUSIONES.....	122
VII. BIBLIOGRAFIA.....	125

I. *INTRODUCCION*

1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL PLOMO

El plomo es un metal pesado de color gris azulado, familiar a todos. Sus características más relevantes son: número atómico 82, peso atómico 207,19, gravedad específica 11,34, temperaturas de fusión y ebullición, a la presión atmosférica, 327,5°C y 1740°C respectivamente. Tiene 4 isótopos naturales, de pesos atómicos 208, 206, 207, 204.

Posee 4 electrones en su órbita de valencia, de los que sólo 2 se ionizan con facilidad, por lo que el estado de oxidación de este metal en sus compuestos inorgánicos es, en general, de +2.

Ambientalmente se encuentra en tres posibles estados:

A. Plomo metálico

Es tóxico al fundirse a 327°C, emitiendo vapores que alcanzan fácilmente los alveolos. Estos vapores se oxidan rápidamente, haciéndose poco solubles y cayendo al suelo. Es la forma fundamental de contaminación ambiental.

B. Derivados inorgánicos

Son derivados inorgánicos los óxidos del plomo como el minio (Pb_3O_4), el litargirio (PbO) y la plattnerita (PbO_2), los cromatos entre los que se encuentra la crocoíta ($PbCrO_4$), los sulfatos y sulfuros como la anglesita ($PbSO_4$) y la galena (PbS), el arseniato de plomo y los carbonatos como la cerusita ($PbCO_3$).

C. Derivados orgánicos

Son derivados orgánicos el acetato de plomo, abortivo, el tetraetilo de plomo, antidetonante, el estearato de plomo, que da consistencia al plástico y el naftenato de plomo, componente de los aceites y grasas de uso industrial (1, 2).

2. FUENTES DE EXPOSICION AL PLOMO

La población general está expuesta al plomo tanto por inhalación como por ingestión. Debido a sus especiales características las poblaciones infantil y laboral serán consideradas en otro apartado.

2.1. EXPOSICION DE LA POBLACION GENERAL

El aire es un claro factor de exposición al metal. Las concentraciones aéreas máximas se encuentran en los centros urbanos densamente poblados, en relación con las horas punta de circulación (1) y con las proximidades de las industrias que trabajan con plomo (3). El tráfico explicaría de un 7 a un 25 % de la concentración sanguínea del metal de la población (4, 5). Por otro lado el 3,5% de las personas que viven en la proximidad de una fuente industrial superan los límites individuales de los 35 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (3) recomendados por el Consejo Directivo de la Comunidad Europea.

El agua es una importante fuente de contaminación cuando las tuberías y depósitos están fabricados con plomo. El pH ácido de las aguas (3, 4, 5, 6) y su estancamiento nocturno, que incrementa el tiempo del contacto de los depósitos con el líquido, aumentan la concentración del metal (7). El agua explicaría un 15 % del total de plomo en sangre (5, 8). Los niños y los ancianos, por su mayor susceptibilidad al metal, son los más afectados por el saturnismo hídrico (9, 10).

La concentración del plomo entre los alimentos varía. En general la leche, la harina y las frutas enlatadas contienen los valores máximos de plomo. Dentro de los productos lácteos el tipo de leche (materna, concentrada,...) y el lugar de origen del ganado influyen en su contenido en este metal (1, 11). La leche maternizada tiene un riesgo adicional, por su preparación con agua, que también puede estar contaminada (12).

Se observan diferencias considerables en el aporte de plomo a través de los alimentos entre países (13, 14, 15, 16). Estos resultados deben interpretarse con

precaución al haberse obtenido mediante el uso de diferentes metodologías y en poblaciones distintas.

Los niveles de plomo en el vino ofrecen importantes variaciones, según el tipo de vino y, dentro del mismo, entre unas muestras y otras (17, 18). La contaminación de la bebida puede ocurrir a lo largo de todo el proceso de elaboración, almacenamiento y consumo: crecimiento de la uva (19), contacto con la maquinaria, tanques de fermentación, almacenamiento-suministro (20, 21), conservación en botellas (22) y encochado (23). En U.S.A. el uso ilegal de los radiadores de automóviles soldados con plomo para la destilación de "whisky" (moonshine) es una importante fuente de intoxicación (24).

Los envasados metálicos y la alfarería popular barnizada con derivados del plomo contaminan, su contenido, con el metal. La concentración en los alimentos y bebidas envasados aumenta con el tiempo, la capacidad corrosiva del alimento o líquido y la presencia de sales o ácidos que cambien el pH (22, 25, 26, 27). En España y E.E.U.U. son numerosas las referencias a intoxicaciones saturninas derivadas del uso de recipientes metálicos o barnizados con el plomo (28-34).

También se han descrito focos de intoxicación en drogadictos parenterales, usuarios de heroína y metanfetamina y en consumidores de opio, por la adulteración de las drogas con plomo (35-38).

El tabaco puede ser otra fuente de exposición al metal (39, 40), si se ha fumigado la planta, durante su crecimiento, con el insecticida arseniato de plomo (1).

Las lesiones por proyectiles de plomo son causa rara de saturnismo, apareciendo descritas en la literatura médica mundial menos de 30 casos (41).

La ingestión de perdigones de plomo, procedentes de los cartuchos de caza, ocasiona cada año la muerte de millones de aves. La posterior ingesta de estas aves por el hombre también provoca su intoxicación (42, 43).

Finalmente, la medicina popular, empleada en el tratamiento de procesos gastrointestinales y catarros, origina casos de saturnismo en el sur de E.E.U.U., Méjico, Sureste Asiático, Arabia y Africa (33).

2.2. EXPOSICION DE LACTANTES Y NIÑOS

El niño preescolar por sus hábitos peculiares de pica (afición a comer sustancias extrañas), chupeteo de manos, tipo de juegos y mayor susceptibilidad, está sometido a riesgos especiales por las fuentes ambientales de plomo.

La prevalencia de concentraciones sanguíneas del metal superiores a los 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$, concentraciones que se han asociado con deficiencias intelectuales, parece ser muy alta. Según una estimación realizada en 1990 por la Environmental Protection Agency de los Estados Unidos 3 millones de niños menores de 6 años de edad superaban esas cifras (44).

La tierra y el polvo son fuentes permanentes del metal para el niño. Su contaminación se produce por la proximidad a industrias con uso de plomo, o a carreteras con tráfico intenso contaminadas por gasolinas plomadas (45-50). En las zonas con suelos contaminados las concentraciones sanguíneas del metal en los niños son más altas y se correlacionan con sus niveles en tierra y polvo (49, 50).

También la ingestión de pinturas descascarilladas es una importante fuente de exposición en niños en E.E.U.U. y el Reino Unido (50). La mayor exposición se produce por el suelo y el polvo, mientras que la ingestión de pintura causa intoxicaciones moderadas y severas (49).

El uso infantil del "khol" o "surma", que es un maquillaje de ojos original de Asia y Africa, ha causado graves intoxicaciones, a través de un mecanismo que comprende el rascado de conjuntiva y la posterior ingestión del metal (33, 51).

La medicina popular usa productos con plomo con diversos fines terapéuticos infantiles: procesos gastrointestinales, erupciones dentales,... (33).

Otras fuentes del metal son las tintas de los "tebeos", las envolturas de caramelos y chicles (9) y las ropas de trabajo del padre, impregnadas con partículas de plomo (52, 53).

2.3. EXPOSICION LABORAL

La intoxicación por plomo es la enfermedad profesional de índole tóxica más extendida en las naciones industrializadas. El número de actividades relacionadas con este riesgo superan el centenar.

Actualmente, debido a la extensa reglamentación laboral, ha disminuído el número de estas intoxicaciones. Con todo en U.S.A., durante 1991, se registraron en 13 estados 19.000 casos con niveles elevados en sangre (54). La máxima incidencia aparece en pequeñas empresas o en aquellos trabajos con plomo que no están incluídos dentro del cuadro de enfermedad profesional. En nuestro país la escasez de empleo ha generado la creación de empresas, con reducido número de trabajadores, sin disponibilidad de servicio médico de empresa e incumplimiento de las medidas de protección (55, 56). Durante los años 1988, 1989, 1990 y 1991, según el Anuario de Estadísticas Laborales de la Subsecretaría de Trabajo y Seguridad Social, se declararon 215, 130, 135 y 149, respectivamente, casos de enfermedad con baja por saturnismo. Estas cifras deben tomarse con cautela, debido a la subestimación del problema porque muchos casos de intoxicación no se registran.

La principal vía de entrada del metal, en la exposición industrial, es la inhalación. Numerosos estudios relacionan la concentración aérea de plomo con los niveles sanguíneos (26, 57, 58). El polvo generado, unido a una mala higiene hacen posible la ingestión de plomo con los alimentos. En el caso de los derivados alquílicos del plomo existe el riesgo potencial de su absorción cutánea (1, 26).

2.4. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA TOXICIDAD DEL PLOMO

2.4.1. Edad

Las concentraciones sanguíneas de plomo más elevadas aparecen alrededor de los 2 años (53, 59) descendiendo los niveles durante el resto de la infancia y adolescencia. Luego comienza un ascenso estadísticamente asociado con la edad hasta los 54 años, a partir de los que aparece, de nuevo, una baja moderada de sus niveles sanguíneos (60).

2.4.2. Sexo

En adultos el plomo en sangre es más alto en hombres que en mujeres, no existiendo estas diferencias en los niños (3, 40, 53, 60, 61, 62).

2.4.3. Raza

Según los datos recogidos por el National Health and Nutrition Examination Survey II (NHANES II) de E.E.U.U. existen valores del metal en sangre más altos en personas de raza negra, pero por la asociación existente entre raza, nivel socioeconómico y urbanismo estos datos deben interpretarse con cautela (60, 63).

2.4.4. Nivel socioeconómico

También en E.E.U.U. se observa una relación significativa entre las concentraciones sanguíneas de plomo y las ciudades muy populosas, relación que es negativa para los ingresos familiares (60).

2.4.5. Hábitos

Las concentraciones sanguíneas de plomo son más altas en fumadores, extendiéndose esta asociación positiva a los fumadores pasivos (53, 62).

2.4.6. Variaciones estacionales

En el verano los niveles sanguíneos son más elevados que en el resto de las estaciones, por la mayor exposición ambiental al plomo, debida al aumento del tiempo de

permanencia al aire libre, y también por el incremento de las radiaciones ultravioletas, que favorecen su absorción (9, 53, 64).

2.4.7. Factores que modifican la susceptibilidad al plomo

El papel del estado nutricional, alterando la susceptibilidad al plomo, es conocido desde hace más de un siglo. La fracción absorbida por la vía digestiva está incrementada en la infancia, el ayuno, el uso de vitamina D, las deficiencias de hierro y calcio, y la presencia de leche, grasas y quelantes (65-69). Por el contrario la toma de magnesio, fósforo y etanol, disminuyen su absorción (66).

3. FISIOPATOLOGIA

3.1. METABOLISMO

La absorción de plomo está supeditada a la cantidad y el estado físico-químico del metal presente en la vía de entrada y a la actividad metabólica del organismo receptor.

3.1.1. Absorción por inhalación

La absorción de plomo inhalado depende de su posterior absorción a través del pulmón o de su deglución y digestión. Los factores que determinan uno de los dos destinos son el tamaño de la partícula, la región respiratoria donde se deposita, la eliminación (relacionada con la solubilidad y toxicidad de la partícula), la profundidad, y el ritmo ventilatorio de la persona (58).

En la inhalación del metal en el ambiente general a cada aumento de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ del plomo en el aire correspondería la elevación de $2 \mu\text{g}/\text{dl}$ del mismo en la sangre. En cambio en la población expuesta laboralmente el incremento de cada $\mu\text{g}/\text{m}^3$ del metal aéreo, en la concentración media semanal de la empresa, se traduce en un aumento de 0,6 a $1 \mu\text{g}/\text{dl}$ del metal en sangre (1).

3.1.2. Absorción por vía digestiva

El tracto gastrointestinal es la principal vía de entrada de plomo en el organismo para la población general, explicando unos 2/3 del metal incorporado (67, 70).

El mecanismo de absorción no es bien conocido, pero no parece ser único, habiéndose encontrado en animales de experimentación un componente duodenal con un transporte común al hierro y al calcio y un componente en íleon (65, 68, 71-75).

Aproximadamente de un 10 a un 15% del metal ingerido con la comida es absorbido (66). El consumo de cantidades de plomo superiores a 1000 $\mu\text{g}/\text{dl}$ produce aumentos sanguíneos que se ajustan a una función logarítmica (1).

3.1.3. Absorción por vía cutánea

Produce la absorción de cantidades despreciables, salvo para el plomo orgánico, que es liposoluble (67).

3.1.4. Distribución, metabolismo y eliminación

Una vez absorbido el plomo pasa a la sangre. Más del 90% circula transportado por el hematíe, en el que se une a la membrana (14%) y a la hemoglobina (80%) (76-78). El resto es transportado por el plasma, unido a la albúmina (4%), las globulinas (0,5%) y los lípidos (1,3%), salvo una pequeña fracción difusible, que es la metabólicamente activa (76-78).

El metal circula en la sangre y se deposita en los distintos órganos, según su vascularización y afinidad intrínseca (79).

Existe a continuación una redistribución del plomo entre la sangre, tejidos blandos (principalmente riñón e hígado) y hueso, que se ajusta a modelos de reparto tricompartmentales (70, 80, 81). En esta situación de redistribución, el metal en sangre y tejidos blandos, constituye la carga corporal intercambiable, que es la de mayor importancia toxicológica. Un 90% se deposita en tejidos duros, como hueso y dientes, que

son los reservorios principales de plomo e indican, por tanto, la exposición acumulativa a largo plazo (82). Finalmente se alcanza un estado de equilibrio, reflejo del cual es la concentración sanguínea.

La tasa de equilibrio del plomo sanguíneo con las fuentes de entrada, salida, y los otros compartimentos orgánicos, ha sido estudiada por Rabinowitz et al (70, 81). Su cinética de aparición y desaparición en la sangre sugiere intercambios de primer grado según los modelos desarrollados por Rabinowitz et al y Dally et al (70, 80).

El plomo atraviesa la placenta por difusión simple y dependiente de la proporción de flujo sanguíneo fetal, existiendo por ello una estrecha relación entre las concentraciones del metal en la sangre materna y las del cordón umbilical (83, 84). Por otra parte se sugiere la existencia en la placenta de una proteína que se une al calcio, como en el intestino, e interviene en el transporte de plomo (85).

La permeabilidad de la barrera hematoencefálica al plomo es muy alta (mil veces superior a la del calcio), y su entrada depende, directa o indirectamente, de la concentración del ión plumboso (86).

La orina es la principal vía de eliminación de plomo en el hombre, suponiendo el 76% del total del metal eliminado (70, 80). Aproximadamente un 16% del metal es excretado por las secreciones gastrointestinal, biliar y pancreática, y el resto por otras rutas como el sudor, las uñas, el cabello, la leche, la saliva y la mucosa bucal (ribete de Burton) (70, 80).

3.2. PATOLOGIA

El plomo afecta muy diversos sistemas orgánicos. A continuación se exponen, brevemente, las alteraciones y mecanismos patogénicos hematológicos, nerviosos, renales, cardiovasculares, y de los sistemas reproductor y endocrino, ocasionados por el metal.

Los dos componentes fundamentales para el mantenimiento del hematocrito en el sistema sanguíneo, la eritropoyesis y la supervivencia de los hematíes, están perturbados por el metal.

En la síntesis de la hemoglobina intervienen varias enzimas, cuatro de las cuales están afectadas por el plomo. La enzima aminolevulínico (ALA) deshidrasa, de localización citoplasmática, es inhibida por el metal y es el indicador más sensible de la exposición al plomo a dosis bajas (76, 87, 88). A nivel mitocondrial el metal bloquea la acción de la enzima ferroquelatasa (78) y en menor grado la de la coproporfirinógeno-oxidasa (78). La disminución de la formación del HEM conduce a su vez a un desbloqueo del normal retrocontrol negativo de éste sobre la ALA sintetasa y a un acúmulo del ácido δ -aminolevulínico (78) y de los otros metabolitos intermedios en la síntesis de HEM. En la degradación de éste la actividad de la enzima hem oxigenasa está incrementada (78) por el metal.

En la intoxicación saturnina también existe una disminución de la vida media de los hematíes circulantes, aumentando el envejecimiento prematuro de los eritrocitos y su destrucción al azar (78). Dos líneas bioquímicas parecen explicar este hecho: la interferencia del plomo sobre la membrana (26, 87, 89) y sobre la enzima pirimidina-5-nucleotidasa, conduciendo esta última al acúmulo de metabolitos del RNA y al punteado basófilo (90).

Se han descrito alteraciones en la síntesis de las globinas con incremento de la α hemoglobina, alteración en la proporción α/β o aparición de cantidades anormales de la hemoglobina A y la hemoglobina F (76).

La anemia saturnina es consecuencia de todas las alteraciones anteriores. Es normocítica, salvo en los niños en los que coexiste con deficiencias de Fe, en los que se manifiesta como microcítica e hipocrómica (78, 91).

En el sistema nervioso la intoxicación plúmbica produce alteraciones tanto a nivel central como periférico.

La encefalopatía saturnina cursa en forma de cuadros meningoencefalíticos atípicos (26). Hoy dado que esta encefalopatía es prácticamente inexistente por las medidas preventivas, la atención médica se dirige hacia la sintomatología subclínica, que en los adultos se manifiesta con cuadros inespecíficos como pérdida de memoria (92) y cefaleas frecuentes (93). En la infancia la exposición subclínica ocasiona deficiencias intelectuales. Estudios epidemiológicos transversales han encontrado una relación positiva entre niveles ligeramente elevados de plomo en sangre (alrededor de los 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$) o en dentina y la disminución en los resultados de pruebas de inteligencia (45, 94, 95), conclusión a la que también llega un estudio de meta-análisis (96). Reforzando esta hipótesis de causalidad están los resultados de varios estudios longitudinales que se realizan en la actualidad (53, 59, 84, 97).

La mayor permeabilidad de las células endoteliales al plomo (98), la interferencia del metal en la sinaptogénesis y en la neurotransmisión de GABA, acetilcolina y dopamina (99, 100, 101) podrían explicar estas alteraciones.

El plomo afecta al sistema nervioso periférico produciendo una disminución del umbral de audición, del tiempo de reacción visual y del periodo de latencia en la conducción motora (26, 102).

Histológicamente estos hallazgos coexisten con desmielinización y degeneración axonal (26, 76, 103). La inhibición de la Na-K-ATPasa, ya por bloqueo directo del plomo, ya por el ALA, aumentaría la permeabilidad vascular y lesionaría las células de Schwann, justificando los hallazgos histológicos.

Las alteraciones producidas en el riñón dependen del tiempo y de la dosis de exposición. Inicialmente, tanto en la intoxicación crónica como en la aguda, aparece un cuadro reversible con aminociduria, glucosuria e hiperfosfaturia. Tras varios años de

exposición disminuye la eliminación de plomo sin afectarse la función renal. Más tarde surge la insuficiencia renal en la que la hiperuricemia es un signo precoz y constante (26, 105). Son necesarios tanto una exposición prolongada al plomo como un periodo de latencia largos para que aparezca esta nefropatía (26, 77, 104).

El interés epidemiológico por las lesiones renales comienza ante una epidemia de nefropatía irreversible en jóvenes adultos australianos, que habían ingerido durante la infancia altas y continuas dosis de plomo y cuya excreción de plomo estaba elevada (26, 105). En E.E.U.U. la nefropatía no se manifestaba en niños sino en bebedores de "whisky" destilado ilegalmente (26).

Estudios de mortalidad, en la población expuesta laboralmente, encuentran un incremento de 2 a 3 veces en el número de las defunciones por nefritis crónicas (103, 106-109).

La afección de la respiración celular mitocondrial por la alteración de las enzimas ALA sintetasa y ferroquelatasa, estaría en el origen de todas estas lesiones.

En los estudios de mortalidad, realizados en trabajadores expuestos al plomo, se encuentra un aumento en las defunciones por accidentes cerebrovasculares (106, 107, 110). En esta población aparece también una mayor incidencia de hipertensión e isquemia cardíaca (107, 108, 110). También en la población general, el NHANES II realizado en los E.E.U.U., descubre una relación entre los niveles sanguíneos del metal y la presión sanguínea entre los 20 y los 74 años (111-113).

El aumento por el plomo del calcio intracelular o su interferencia en la proteínquinasa C, mecanismos envueltos en la contracción de la musculatura lisa vascular, y la alteración por el metal de las hormonas del eje renina-angiotensina-aldosterona, podrían explicar estos hallazgos (77, 113, 114).

Hace ya un siglo que se menciona en la bibliografía médica la mayor frecuencia de abortos y de partos de fetos muertos entre las mujeres trabajadoras en la industria del metal. Los estudios epidemiológicos realizados actualmente confirman este hecho así como la asociación de las concentraciones sanguíneas de plomo y las malformaciones fetales de menor grado (84). El metal interfiere a nivel de la blastogénesis, disminuye la progesterona (115, 116) e inhibe el eje hipotálamo-gonadal (117).

En el sistema gonadal masculino se ha descrito una disminución en el número y la motilidad de los espermatozoides y un aumento del esperma morfológicamente anormal (118, 119) por este metal. En algunos de estos pacientes parece coexistir con alteraciones a nivel central (118).

El plomo interrumpe también la entrada de yodo a la glándula tiroides, descende los niveles de glucocorticoides basales y en respuesta a los estímulos, así como también produce una lesión del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal (26, 118).

La concentración de 1,25 hidroxivitamina D se reduce por el metal (103).

En el NHANES II aparece una importante correlación entre la disminución de estatura y los niveles sanguíneos del metal entre los 5 y 35 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (120).

Es clásica en la intoxicación la existencia del cólico saturnino (30, 39, 56).

Las artralgias y las artritis gotosas se asocian con la exposición plúmbica, fundamentalmente con la crónica (26, 121, 122).

Las lesiones por bala localizadas en las articulaciones causan una osteolisis incompleta (123) con secuestro de plomo y continuo reciclaje del metal, que se convierte en fuente perenne en el organismo.

3.3. PLOMO Y CARCINOGENESIS

Se han realizado diversos estudios de mortalidad que investigan el posible aumento de neoplasias en la exposición al plomo. En un antiguo estudio ecológico realizado en

Estados Unidos se ha relacionado la cantidad de metal en el agua de consumo y la mortalidad por cánceres, siendo positiva para los linfomas, las leucemias y las neoplasias renales (124).

En estudios con trabajadores expuestos al plomo se evidencia un incremento en el fallecimiento por cánceres en general (125), por neoplasias del tracto digestivo en los años anteriores a 1966 (106) y por cánceres de estómago (125), hígado (126) y riñón (109). En un estudio de meta-análisis se confirma la relación entre el plomo y los tumores renales (127), mientras que en otro con diseño de cohortes, retrospectivas, se descubre un aumento casi significativo por cáncer de pulmón (128).

Estudios realizados en animales de experimentación apuntan hacia el papel carcinogénico del plomo en tumores renales y cocarcinogénico en adenocarcinomas pulmonares (129, 130).

4. PLOMO E INMUNIDAD

4.1. CAMBIOS EN LA RECEPTIVIDAD A DIVERSOS AGENTES BACTERIANOS, VIRALES Y NEOPLASICOS

Numerosos investigadores han descubierto que el plomo, a dosis bien toleradas, aumenta la letalidad por endotoxinas de *Escherichia Coli*, *Shigella*, *Serratia*, varias cepas de *Salmonella* y de la flora fecal mixta (131-137). La disfunción del sistema retículoendotelial podría ser el mecanismo de acción (131), por compromiso de su actividad fagocítica. Se han publicado, sin embargo, resultados discordantes sobre la función fagocitaria: está aumentada en algunos trabajos (132), disminuía en otros (133) e inalterada según otros más (136).

Se ha investigado la posible intervención del factor de necrosis tumoral (TNF) en este incremento de la susceptibilidad a las endotoxinas provocado por el plomo, ya que esta citoquina la producen los macrófagos en respuesta a las endotoxinas y toxinas

bacterianas (137). El uso de anticuerpos contra el TNF previene el aumento en la receptividad a las endotoxinas por el metal, hecho que sugiere el papel causal de este factor de necrosis tumoral.

Existen diversos factores que modifican este sinergismo en la susceptibilidad provocado por el metal y las endotoxinas. En primer lugar depende de la vía de administración de ambos, siendo máximo cuando se administran intravenosamente, en un intervalo de tiempo menor de 7 horas (135). La juventud aumenta también este sinergismo. Debe considerarse la existencia de tolerancia a las endotoxinas, ya que el pretratamiento con éstas disminuye la letalidad de su administración combinada con el metal (135). Sin embargo, no existe especificidad de especie, ya que aparece en ratas, ratones, pollos, mandriles y otros primates (131- 133, 135).

También se ha investigado si el plomo aumenta la vulnerabilidad a bacterias Gram- (*E. coli*) y Gram+ (*Estafilococo*), produciéndose sólo con componentes termoestables de las primeras (134).

Otros autores (133) han descubierto la capacidad de este metal para sensibilizar hacia otras formas de "shock" (traumático, isquémico), por lo que mecanismos más complejos que los sugeridos anteriormente deben estar implicados en este general aumento de vulnerabilidad.

El plomo incrementa la letalidad por virus de la encefalomiocarditis (138, 139), acortando además el tiempo hasta el óbito. También el virus Rauscher de la leucemia murina se activa por el metal (140). La posible causa de este aumento de vulnerabilidad a los virus es la acción del metal sobre el interferón (138, 139).

El plomo también acrecenta la incidencia de tumores. Su administración subcutánea y oral, crónica, ocasiona tumores renales (129). La exposición intratraqueal produce lesiones de metaplasia alveolar y proliferación adenomatosa (130).

4.2. PLOMO E INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR

Una baja titulación, o baja acción, de los anticuerpos podrían ser las responsables del aumento de susceptibilidad a las endotoxinas, bacterias y virus, ocasionado por el plomo.

La titulación de anticuerpos frente al virus de la seudorrabia está disminuída (141).

En la exposición crónica al metal se reduce la formación de anticuerpos en la respuesta primaria y, más intensamente, en la secundaria (142), mientras que en la exposición aguda su formación en la respuesta primaria aumenta y en la secundaria descende (143). Esta formación de anticuerpos disminuye sobre todo cuando los antígenos utilizados son macrófago dependientes (144).

Sin embargo la estimulación policlonal de los linfocitos B por los mitógenos, que es inespecífica, aparece aumentada o inalterada (145).

Existen numerosos factores que parecen influir en la respuesta de la inmunidad humoral al plomo, además del factor tiempo ya mencionado. El antígeno empleado (146), el tipo (*in vivo* o *in vitro*) (147) y la vía de exposición (148), y la cepa de ratón (149) modifican los efectos del plomo en la respuesta humoral.

En humanos se descubre un aumento en el recuento de los linfocitos B (150, 151). Las inmunoglobulinas (Ig) G, M y A séricas y la IgA de saliva están disminuídas (151, 152). Otros estudios no encuentran, sin embargo, cambios humorales (153, 154).

La modificación de la inmunidad celular por el plomo también podría causar todas las alteraciones anteriormente descritas.

En primer lugar el timo, lugar de diferenciación de las células T, disminuye su peso, en la exposición crónica al metal (155).

La hipersensibilidad retardada se reduce (155, 156), relacionándose además con las concentraciones sanguíneas de plomo. La reacción de los linfocitos mixta (MLR) aumenta

(157, 158), pero es una medida de la inmunidad celular que se realiza *in vitro*.

La respuesta proliferativa de los linfocitos T a los mitógenos, realizada *in vitro*, incrementa cuando la exposición con el metal se hace *in vitro* (158, 159) y disminuye en la exposición *in vivo* (145, 158). Sin embargo no cambia cuando el contacto, tanto con el mitógeno como con el plomo, se verifica *in vivo* (159).

La forma de exposición al metal y el tipo de ensayo parecen influir, por lo tanto, en la respuesta de la inmunidad celular producida por el plomo (160).

La producción de interferón no cambia (161) y la de interleuquina 2 desciende basalmente, pero se mantiene tras la estimulación *in vitro* por el mitógeno concanavalina A (162).

Existe una tercera población de células linfoides: las células asesinas naturales. Su actividad citotóxica, en la exposición *in vivo*, al metal no cambia, mientras que si la exposición es *in vitro* disminuye (163).

En el hombre el recuento de los linfocitos T totales y los T₈ están aumentados en los trabajadores expuestos (151), pero el porcentaje de linfocitos T está disminuído (150, 151). Otros estudios no han podido corroborar estos resultados (164, 165).

La respuesta de los linfocitos humanos a los mitógenos está disminuída o mantenida (164, 165). El metal parece tener una actividad mitógena por sí mismo (165).

4.3. PLOMO, GRANULOCITOS Y MACROFAGOS

Después de una inyección de plomo aparece neutrofilia (166). Sin embargo en la exposición crónica al metal se descubre una disminución de los granulocitos y un aumento en los linfocitos (167).

El plomo reduce la acción de la enzima mieloperoxidasa y la capacidad de yodación asociada con ésta (168).

La viabilidad celular de los granulocitos humanos expuestos *in vitro* disminuye (169) y también está descendida su capacidad quimiotáctica (170, 171, 172).

Los resultados en la actividad fagocítica granulocítica son más contradictorios, no modificándose (171, 173) o reduciéndose (169).

Se ha descubierto una disminución en el número de los macrófagos alveolares y medulares, en la exposición al metal (174, 175, 176).

La viabilidad celular de los macrófagos peritoneales decrece y la de los alveolares permanece inalterada tras contacto *in vitro*, pero se mantiene después de contacto *in vivo* con el plomo (177, 178, 179).

Los resultados en la fagocitosis de los macrófagos son contradictorios: se inhibe (180), aumenta (178) o no cambia (181).

La acción tumoricida de los macrófagos de ratones expuestos a este metal no se afecta, independientemente del hecho de que estén o no inmunizados frente a las células tumorales (182).

El plomo interfiere también en la acción de las citoquinas factor inhibidor de la emigración (MIF) (178) y factor activador de macrófagos (MAF) (183).

La presentación de antígenos por esplenocitos o macrófagos peritoneales desciende (181), pero en células de Langerhans aumenta la expresión de las moléculas de histocompatibilidad de la clase II, que están en estrecha relación con esta función (184).

5. DIAGNOSTICO DEL SATURNISMO

Se utilizan dos tipos de indicadores del saturnismo, unos que miden la exposición o dosis interna y los otros su efecto toxicológico.

5.1 MARCADORES DE DOSIS INTERNA

Recogen los valores de plomo en los diversos medios biológicos, siendo la mejor aproximación al estado de absorción del tóxico.

5.1.1 Plumbemia en sangre

Refleja el equilibrio metabólico frente al plomo, refiriendo la absorción media de aproximadamente 1 mes.

Los valores límites en población no expuesta son de 30 $\mu\text{g}/\text{dl}$ para los adultos y de 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ para niños, según recomendaciones del Centers for Disease Control (185). Estos valores para la población trabajadora se sitúan en 70 a 80 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (186).

Es el indicador más sensible de la toxicidad (36). Existe además una estrecha relación de esta plumbemia sanguínea con la dosis de exposición externa, la gravedad clínica, el número de órganos alcanzado por el tóxico y la intensidad de los efectos biológicos detectados (36).

5.1.2. Excreción basal de plomo en orina

Es un reflejo deformado de la concentración sanguínea por depender de la función renal, por lo que actualmente no se recomienda su uso.

Sus valores normales se encuentran entre 30 y 80 $\mu\text{g}/\text{día}$. La sensibilidad de esta prueba es del 60% y su especificidad del 90% (36).

5.1.3. Plumburia provocada por EDTA

Es el mejor índice de la carga corpórea total y de la cantidad metabólicamente activa.

En niños su límite superior es de 500 $\mu\text{g}/\text{día}$, en adultos, no expuestos laboralmente, de 600 $\mu\text{g}/\text{día}$ y en los trabajadores de 1000 $\mu\text{g}/\text{día}$ (9, 36, 187).

Su sensibilidad es superior al 97% (7), pero su especificidad es más baja.

Su seguridad como prueba de despistaje está actualmente cuestionada al haberse descubierto en animales de experimentación, a los que se administró EDTA, un aumento del 100% de los niveles cerebrales del plomo (188).

5.1.4. Contenido de plomo en tejidos

Las concentraciones de plomo en cabello y dentina se han utilizado como marcadores de la dosis interna, en diversos estudios epidemiológicos (36, 95, 96, 189).

En la población trabajadora expuesta al metal se practica, en la actualidad, la valoración del contenido óseo mediante técnicas radiológicas de fluorescencia (190, 191). También se está evaluando la posibilidad de utilizarla como prueba de cribado diagnóstico (191).

5.2. MARCADORES DEL EFECTO BIOLÓGICO

Traducen la existencia de una lesión orgánica y muestran los resultados metabólicos de la intoxicación.

5.2.1. Actividad de la enzima aminolevulínico deshidrasa (ALA-D)

El plomo tiene una gran afinidad por los grupos sulfhidrilo de esta enzima citoplasmática, a los que bloquea a partir de concentraciones de 5 a 15 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (36). Como consecuencia se impide la unión de las moléculas de ácido aminolevulínico y la formación de porfobilinógeno.

Su valor normal es de 300 unidades/ml (36).

La sensibilidad y especificidad de esta prueba son del 98% (7).

5.2.2. Determinación de la protoporfirina eritrocitaria libre

(PEL) o protoporfirina cinc (ZnPP)

Su inhibición resulta de la interferencia del plomo en la ferroquelatasa mitocondrial, que impide la inserción de hierro a la porfirina, y produce la formación de porfirina libre (PEL). Ante el defecto del hierro la porfirina se une al cinc y forma la protoporfirina-Zn (ZnPP). La relación entre ambas es muy alta por lo que pueden usarse indistintamente.

Su concentración normal límite es de 35 $\mu\text{g/dl}$ (192).

Su sensibilidad es ligeramente inferior a la de la aminolevulínico deshidrasa (36). El C.D.C. cuestiona su uso como prueba de despistaje infantil al no ser lo suficientemente sensible para concentraciones sanguíneas de plomo inferiores a 25 $\mu\text{g/dl}$ (185).

5.2.3. Determinación de la pirimidín-5-nucleotidasa

Esta enzima degrada los catabolitos del RNA (90), produciendo su inhibición por el metal un acúmulo de los metabolitos de los ácidos nucleicos.

Se está investigando su uso en el diagnóstico de saturnismo porque aporta una buena sensibilidad, su umbral de efecto se sitúa alrededor de los 15 $\mu\text{g/dl}$ y posee unas buenas correlaciones lineales con la plumbemia en sangre ($r=0,8$) (55).

5.2.4. Determinación del ácido aminolevulínico urinario (ALA-U) y del coproporfirinógeno en orina (CPU)

Cada día son menos utilizadas, aunque la primera siga empleándose en el diagnóstico de intoxicación entre la población laboral expuesta en nuestro país (186, 193).

6. TRATAMIENTO Y CONTROL DE LA EXPOSICION PLUMBICA

El antídoto clásico es el EDTA-Ca-Na₂ (etilén diamino tetraacético cálcico disódico). Se emplea, intravenosamente, en adultos con concentraciones sanguíneas de plomo superiores a 80 µg/dl (2) y en niños con niveles de 25 a 55 µg/dl (192). La dosis no debe superar los 50 mg/Kg/día y se administra durante 5 días (2).

El dimercaprol (BAL) se aplica conjuntamente con el EDTA, intramuscularmente, en caso de encefalopatía, ya que el EDTA-Ca-Na₂ no atraviesa la barrera hematoencefálica (2).

Como tratamiento de mantenimiento en las intoxicaciones crónicas se utiliza la D-penicilamina oral (194). Es efectiva en reducir los niveles sanguíneos de plomo, a bajas concentraciones, pero existen datos experimentales que sugieren una redistribución del plomo del hueso a los tejidos blandos, con su uso, con lo que los niveles cerebrales del metal podrían no descender (188).

El ácido dimercaptosuccínico (DMSA), es un quelante soluble, administrable oralmente, recientemente aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) (195) para el tratamiento de niños con concentraciones de metal superiores a 45 µg/dl (188). En España también se ha utilizado en adultos (196).

Además se aplica, lógicamente el tratamiento sintomático complementario adecuado para complicaciones como la encefalopatía, la nefropatía, los cólicos, etc,... (sedantes o barbitúricos, mantenimiento de la función renal, atropina, etc,...).

7. PREVENCIÓN DEL SATURNISMO

7.1 PREVENCIÓN PRIMARIA

Ha de actuar sobre todos los factores que influyen en la aparición del saturnismo.

Es fundamental el componente de profilaxis ambiental. Dentro de éste se ha regulado la cantidad máxima del metal en el agua (197), alimentos (198), vinos (199), envasados y cerámica popular (55). La cantidad de plomo en la gasolina se ha reducido a 40 µg/dl (200). En E.E.U.U. también se legisló en 1977 una importante disminución en sus concentraciones en pinturas (50).

La buena higiene laboral y hogareña con medidas como la ducha, el lavado de manos y la limpieza de las casas son importantes para la erradicación laboral e infantil del saturnismo (96, 198).

Los programas de educación sanitaria encaminados al asesoramiento de padres de niños de zonas de riesgo es fundamental (198).

Los suplementos nutricionales de hierro, calcio o cinc en los niños, contribuyen a disminuir su mayor absorción y susceptibilidad al metal (192).

En la prevención primaria laboral nuestro país se rige según la Orden del 9 de abril de 1986 (186). En ella se define el concepto de trabajador expuesto a partir de las concentraciones ambientales y biológicas del metal.

7.2. PREVENCIÓN SECUNDARIA

La prevención biológica secundaria ha conducido, en los Estados Unidos, a la realización de programas de despistaje. Actualmente, la American Academic of Pediatrics recomienda el cribado diagnóstico anual o semianual en niños en altas zonas de riesgo o con factores predisponentes (192).

La legislación española prevee la determinación de plomo en sangre y de

protoporfirina-Zn, así como del ácido deltaaminolevulínico en orina (ALA U) y de la deshidrasa del ácido δ - aminolevulinico en sangre (ALA D) con una periodicidad anual, bianual o trimestral, dependiendo de las concentraciones sanguíneas y las ambientales (186, 201).

Cuando las concentraciones sanguíneas del metal están elevadas el tratamiento comprende el uso de quelantes del plomo, la mejora del estado nutricional y el aporte de suplementos de hierro (192).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Profundizar en el conocimiento de las alteraciones producidas por bajas dosis de plomo, un tóxico ambiental, por medio de un modelo *in vivo*. Para ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Valorar el efecto que el plomo, ejerce en el número, viabilidad y composición de las células peritoneales.

2. Evaluar los efectos del plomo sobre la función de las células peritoneales, en particular sobre el macrófago residente, mediante los siguientes parámetros:
 - 2.1. Adherencia de células y macrófagos residentes peritoneales.
 - 2.2. Movilidad dirigida o quimiotaxis y movilidad espontánea.
 - 2.3. Capacidad fagocítica y fungicida de las mismas.

III. MATERIAL Y METODOS

1. ANIMALES DE LABORATORIO

Se empleó, para todos los experimentos, hembras Balb/c singénicas, suministradas por Charles River. Su edad al inicio de los distintos estudios era de 4 semanas \pm 4 días y al finalizarlos de 14 semanas \pm 4 días.

Los ratones fueron seleccionados y distribuidos al azar en los grupos testigo y de exposición a 13, 130 y 1300 ppm de acetato de plomo, utilizando una tabla de números aleatorios. Esta distribución aleatoria se hizo tanto para el grupo de exposición, como para los ratones asignados a cada grupo.

Al finalizar las distintas exposiciones los ratones eran sacrificados por dislocación cervical, que es una técnica que produce insensibilidad instantánea y utilizados en los distintos experimentos. Los cadáveres eran desechados después de comprobar su rigidez cadavérica.

1.1. CONDICIONES DE MANTENIMIENTO DE LOS RATONES

Se siguieron las directrices de las Comunidades Europeas referentes a la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos (202).

Los locales que albergaban a los animales contaban con la ventilación e iluminación adecuadas. La temperatura ambiental osciló entre los 18 y 24 °C. La limpieza del animalario se realizó dos veces por semana. Mientras se efectuaron los experimentos un veterinario asesoró e inspeccionó, periódicamente, los locales.

Las jaulas eran de material plástico, autoclavables para la esterilización. El lecho estaba formado por viruta de madera esterilizada y comercializada, sin presencia de colorantes, insecticidas, fungicidas, ni productos químicos (**ULTRASORB, PANLAB**). La superficie por animal era de 200 cm² para las unidades de cría y de 120 cm² para los de experimentación. La limpieza de las jaulas se hizo dos veces por semana, con lejía

comercial de 50 g/l. Se añadían 4 gotas/l de agua.

El suministro del agua, *ad libitum*, se realizaba mediante biberones de vidrio transparente, que permitían el control de su contenido. Este líquido se cambiaba dos veces por semana y se desinfectaban los biberones con lejía diluída en agua. Los ratones se alimentaron con un pienso granulado (PANLAB SL), *ad libitum*. Diariamente se vigiló la existencia de ambos suministros.

Mientras duró la experimentación los ratones no presentaron patología.

1.2. EXPOSICION AL PLOMO

La exposición fue siempre *vía oral*, a través del agua de la bebida, durante un tiempo de 70 días (139, 141, 142, 144, 155, 158, 179).

Se empleó acetato de plomo cristalizado ($C_2H_3O_2)_2Pb \cdot 3H_2O$ (Panreac), que se diluía en agua desionizada caliente, a 37 °C, hasta conseguir una concentración pura de plomo de 13, 130, 1300 ppm, según el grupo de exposición. Los animales testigo recibían agua desionizada. El líquido se cambiaba dos veces por semana, y diariamente vigilábamos que su disolución fuera perfecta. Semanalmente calculamos el consumo de agua por ratón.

Se realizó un experimento previo con estas mismas concentraciones de plomo, durante 10 semanas. El análisis de los resultados nos demostró el consumo similar de líquido por ratón, entre los diferentes grupos de exposición y los animales testigo, por lo que consideramos adecuada la exposición al metal por esta vía.

1.3. VIGILANCIA DE LOS RATONES DURANTE LA EXPOSICION

Dos veces por semana se comprobaba que los ratones no mostraran signos de enfermedad. Una vez por semana se controló el peso, durante las 10 semanas, en una báscula de precisión (August Sauter K G Ebingen, Germany).

Cuando finalizó la exposición se valoró el estado del sistema sanguíneo mediante el recuento de hematíes y de leucocitos y la fórmula leucocitaria.

Las extracciones de sangre se realizaron del saco retroorbitario, mediante tubos capilares heparinizados (Dade) y pipetas Potain para glóbulos rojos y blancos. Después de hacer las diluciones adecuadas, 1/200 para los hematíes y 1/20 para los leucocitos, se hizo su recuento en un hemocitómetro.

El N° de hematíes se obtenía mediante la fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de hematíes en 1 cuadrado} * 200 * 10.000$$

El N° de leucocitos se obtuvo mediante la fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de leucocitos en 1 cuadrado} * 20 * 10.000$$

El frotis sanguíneo, que se utilizó para hacer la fórmula leucocitaria, se fijó y tiñó mediante el preparado Diff-Quik^R (Dade). Se contaron 200 células blancas en 4 campos diferentes y se calculó el porcentaje y el número de cada línea celular de la serie blanca.

2. DETERMINACION DEL PLOMO RENAL

2.1. MATERIAL DE ESTUDIO

Dado que el riñón es uno de los principales órganos de acúmulo de plomo, se eligió la concentración renal como indicador de la exposición plúmbica.

Se desinfectaba la piel abdominal con povidona yodada. Después de extraerse el intestino se obtenían los riñones, que se limpiaban con una gasa, se pesaban en una báscula de precisión (August Sauter K G Ebingen, Germany) y se guardaban en un arcón congelador a -70°C (Revco Scientific Mod. ULT 390-V.N.R.), hasta la liofilización y posterior análisis de su contenido en plomo.

El equipo instrumental constó de un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer HGA 400, muestreador automático AS-40, sistema de recogida de datos Data System 10 e impresora PR-100. Alternativamente al Data System 10 los datos se pueden recoger directamente en una impresora Epson-FX-85.

2.2. REACTIVOS

- * HNO₃ concentrado Merck suprapur.
- * Solución amoniacal de molibdato amónico
715 mg de molibdato amónico (Merck pa), 50 ml de amoníaco concentrado (Merck suprapur) y agua hasta 100 ml. Esta solución se diluye para trabajar 1/5.
- * Solución patrón concentrada: Solución de Pb de 1000 µg/ml.
- * Solución patrón diluída: Solución de Pb de 10 µg/ml, preparada a partir de la anterior.
- * Solución patrón de trabajo: Solución de Pb de 100 µg/l, obtenida a partir de la anterior.

2.3. MATERIAL DE TRABAJO

- * Micropipetas automáticas.
- * Matraces, pipetas, tubos de vidrio neutro.
- * Material de plástico desechable.

2.4. PROCEDIMIENTO

2.4.1. Tratamiento y preparación de las muestras

Se realizó según la metodología desarrollada por Arroyo et al (203).

Los riñones se recogieron en tubos de plástico de polipropileno. Previamente los tubos se aclararon durante una noche en agua destilada, se trataron con ácido nítrico diluído en agua destilada durante otra noche y aclararon 5 veces con agua destilada.

Los riñones liofilizados se recogieron en tubos de vidrio de 10 ml, perfectamente graduados y tratados como los tubos de plástico. Se les añadió 1 ml de HNO₃ concentrado,

al que se dejó actuar durante toda una noche y después se sometieron a una temperatura de 70°C y vibración, durante 2 horas. Una vez enfriados se completó el volumen hasta 10 ml con agua destilada y se homogeneizó mediante agitación mecánica. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, para separar la posible presencia de grasa inatacada, a pesar de que no afecta al posterior análisis.

2.4.2. Determinación del plomo

Se realizó según metodología de Arroyo et al (203).

Fijadas las condiciones operatorias del sistema instrumental y una vez depositadas las muestras en los viales del muestreador, se procedió al paso automático de las muestras.

Las condiciones experimentales del espectrofotómetro fueron:

Línea de resonancia	283,3nm
Posición de la rendija	0,7slit
Lámpara	cátodo hueco de Pb
Intensidad de la corriente	10 mA
Corrector de fondo	Si
Area del pico	5s

Las condiciones de trabajo del espectrofotómetro en las diversas etapas respecto a temperaturas y tiempos fueron:

Secado:	
Etapa 1	0-80 °C, 1 segundo
Etapa 2	80-120 °C, 5 segundos
Etapa 3	120 °C, 35 segundos
Incineración	120-800 °C, 25 segundos
Atomización	2300 °C, 5 segundos
Limpieza de tubo	2700 °C, 3 segundos

En el muestreador automático, las condiciones eran:

Volumen de la muestra	20 µl
Volumen medio de mantenimiento	20 µl

Los datos analíticos se recogieron directamente en la impresora. La concentración de plomo renal se obtuvo a partir de estos datos mediante la aplicación de la fórmula:

$$[\text{Pb}] = \frac{a \cdot 10^{-2}}{M}, \text{ en la que:}$$

[Pb] = concentración del metal ($\mu\text{g/g}$).

a = ppb.

M = g de peso seco.

3. *OBTENCION Y RECUENTO DE LAS CELULAS PERITONEALES RESIDENTES*

3.1. MATERIAL

- * Jeringas desechables de 10 ml y 2 ml
- * Povidona yodada
- * Algodón
- * Solución balanceada de Hank's (HBSS) tamponada con 10mM
- * Hepes, pH de 7,2
- * RPMI-1640 tamponado con 10mM Hepes, pH de 7,2
- * Tubos de centrífuga, estériles
- * Centrífuga (Janetzki T 32c)
- * Agitador de tubos (Reax 2000, Heidolph)
- * Hemocitómetro (Cámara de Neubauer)
- * Micropipetas automáticas y puntas para micropipetas
- * Hembras Balb/c

3.2. PROCEDIMIENTO DE OBTENCION

Se sacrificó a los ratones por dislocación cervical. Se limpió la piel con povidona yodada.

La obtención de las células peritoneales se hizo según el método descrito por Leijh et al (204). Se realizó una incisión de unos 5 cm en la piel, se abrió y se separó de la cavidad abdominal. Se inyectó un volumen de 4 ml de HBSS o de RPMI-1640 (Sigma) (dependiendo del experimento). Se eligió este volumen después de varios experimentos previos, que nos mostraron que era la dilución que nos producía la recogida de mayor cantidad de células peritoneales.

La inyección se realizó a lo largo de la línea media anterior y se hizo circular el fluido mediante masaje abdominal, durante 1 minuto. El fluido peritoneal se obtuvo por la inserción de una aguja en el flanco izquierdo y aspiración.

Se recogió en tubos de centrifuga estériles, de plástico o de vidrio siliconizado, cerrados con algodón o tapones de caucho, dependiendo del experimento.

El líquido peritoneal se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en un medio de mantenimiento, que varió dependiendo del experimento.

3.3. RECUENTO DEL NUMERO DE CELULAS PERITONEALES

Se obtuvieron 4 alícuotas de la suspensión celular y se diluyeron 1/10 en solución de Hank's. Se hizo su recuento en cámara Neubauer con objetivo de 40 aumentos, valorándose para cada alícuota la media por cuadrado de la lectura del retículo de los 4 cuadrados de las esquinas de las dos cámaras del hemocitómetro de Neubauer (205). Se mediaba el resultado obtenido de esta forma de las 4 alícuotas.

El número de células/ml se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Recuento medio} \times 10000 \times 10$$

El número total de células se obtenía multiplicando el número de células/ml por el volumen de la suspensión celular, del que se obtenían las 4 alícuotas.

En los experimentos en los que los recuentos celulares se empleaban para otras técnicas se empleaba 2 alícuotas, siendo el resto del procedimiento semejante.

4. MEDIDA DE LA VIABILIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR

Tanto la exposición al plomo como factores de tipo técnico pueden alterar la integridad de la membrana celular. Esta integridad se midió mediante la exclusión del colorante azul de trípano al 0,4% (206), colorante que no penetra las membranas leucocitarias sin solución de continuidad.

4.1. MATERIAL

Colorante azul de trípano (Merck) 4% en H₂O 20ml

Solución salina 0,14M c.s.p.100ml

4.2. PROCEDIMIENTO

Se hicieron 3 alícuotas de 100 μ l de la suspensión celular en 100 μ l de solución de Hank's, a las que se añadieron 200 μ l de azul de trípano al 0,4%. Se mezclaron cuidadosamente en un agitador de tubos y se esperó 5 minutos para su lectura.

Se agitó, se recogió cada una de las suspensiones con una pipeta Pasteur y se hizo el recuento en cámara Neubauer de un mínimo de 200 células peritoneales, con objetivo de 40 aumentos. Se contaron las células viables (no teñidas) y las no viables (teñidas de azul). La viabilidad se obtuvo mediante la aplicación de siguiente fórmula y hallando luego la media de las 3 alícuotas:

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{Células viables}}{\text{Células viables} + \text{Células no viables}} * 100$$

5. PURIFICACION DE LAS CELULAS PERITONEALES

5.1. PURIFICACION DE HEMATIES

Cuando las células peritoneales estaban contaminadas por una cantidad de hematíes mayor del 5%, se procedía a su hemólisis, mediante tris-cloruro amónico según el método descrito por Hudson y Hay (207).

5.1.1. Material

* Tris 0,17 M (hidroximetil amino metano).

* Buffer de lisis de cloruro amónico:

Cloruro amónico	8,2900 g
Bicarbonato potásico	1,0000 g
EDTA-Na ₂	0,0372 g
Agua destilada	1000 ml

Se añadió 10 ml de Tris 0,17 M a 90 ml del buffer de cloruro amónico y se ajustó a pH 7,2.

5.1.2. Procedimiento de hemólisis

Se suspendió la mezcla leucocito eritrocitaria en 10 ml de tris-cloruro amónico a 4°C, manteniéndose a esta temperatura durante 10 minutos.

Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y se lavó con PBS. El sedimento se resuspendió en el medio de mantenimiento, y se hizo un recuento de las células blancas y de su viabilidad en cámara de Neubauer.

5.2. OBTENCION DE UNA POBLACION PERITONEAL RICA EN MACROFAGOS

Es imposible obtener una población peritoneal compuesta sólo por macrófagos, pero se pueden conseguir poblaciones altamente enriquecidas en estas células. Una de las técnicas empleadas con este fin es la adherencia al plástico o vidrio, que fue descrita por

Mosier (208). Este procedimiento permite la separación de las células de una suspensión celular en adherentes (ricas en macrófagos) y no adherentes (ricas en linfocitos).

5.2.1. Material

- * Solución balanceada de Hank's tamponada con 10mM HEPES (Sigma)
- * Suero fetal de ternera (Gibco)
- * Solución salina tamponada con fosfato (PBS)
- * Tripsina (Trypsin, Pankreasprotease; Merck)
- * Placas MIF (Sterilin, England)
- * Micropipetas y puntas estériles
- * Pipetas Pasteur estériles

5.2.2. Procedimiento

Las células peritoneales se suspendían en un medio de mantenimiento compuesto por Hank's tamponado con 10mM de HEPES y un 10% de suero fetal de ternera descomplementado (Gibco).

Se utilizaron para la adherencia placas MIF de plástico. Se partió de diversas concentraciones de células peritoneales de $1 \cdot 10^6$ a $2 \cdot 10^6$ /ml incubadas a 37°C durante un tiempo de 2 horas. Para su posterior recuperación se siguieron diversos procedimientos.

El primer método ensayado se hizo según el método del choque térmico descrito por Pennline (209). Se decantó la población peritoneal no adherida, mediante la inclinación de la placa, formando un ángulo de 30°C y absorbiendo cuidadosamente el medio de mantenimiento con una pipeta Pasteur, y el posterior lavado con solución salina de Hank templada. Luego se sometió a las células adheridas a un shock térmico. Para ello se añadió Hank's helado y se mantuvo la placa a 4° C durante 15 minutos, recuperándose a continuación las células adheridas.

Se ensayó otro método de recogida de las células adheridas, que consistía en la incubación con tripsina al 0,25% en PBS según el método descrito por Hudson y Hay (210). Se añadió tripsina-PBS y se mantuvo durante 30 segundos a temperatura ambiente, se vertió y se incubaron las placas a 37° C durante 5 minutos. Se incorporó el medio de mantenimiento y se obtuvieron las células por aspiración con una pipeta Pasteur.

Se midió la viabilidad de las células peritoneales recuperadas mediante la exclusión del colorante azul de tripano.

6. DETERMINACION DE LA COMPOSICION CELULAR PERITONEAL

Dada la posibilidad de la existencia de una variación en la proporción de las diversas células peritoneales por la exposición al plomo, desarrollamos para su investigación el empleo de una técnica citológica, de May-Grünwald-Giemsa.

6.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

El sedimento celular era cuidadosamente agitado durante 1 minuto en un agitador de tubos y mezcladas 5×10^5 células/ml con 1 gota de suero fetal de ternera, según modificación del método descrito por Brummer et al (211).

Se hacían dos extensiones sobre dos portas para cada animal, y se dejaban secar a temperatura ambiente.

6.2. TINCION CON LA TECNICA DE MAY-GRUNWALD-GIEMSA

Se utilizó el preparado Diff Quik^R.

Los frotis se introdujeron 10 veces en la solución fijadora de Fast Green en metanol, dejándose gotear el exceso.

Se metieron 10 veces en la solución de Eosina G tamponada con fosfato, se dejó gotear el colorante sobrante y a continuación se introdujeron 10 veces en el colorante

tiazina tamponado con fosfato.

Los frotis se aclararon abundantemente con agua destilada, se dejaron secar y se miraron con objetivo de inmersión, haciéndose un recuento de un mínimo de 200 células elegidas en 4 campos diferentes.

7. ESTUDIO DE LA ADHERENCIA DE LAS CELULAS PERITONEALES

Los macrófagos son células que tienen la propiedad de unirse a sustratos sólidos. Esta propiedad puede usarse para obtener una población rica en macrófagos, como mencionamos anteriormente, o como una función de la población celular, que es la que quisimos medir en este apartado.

7.1. MATERIAL

- * Tubos de centrífuga de plástico estériles
- * Discos de plástico estériles, placas MIF (Sterilin)
- * Tubos de plástico estériles de 5 ml
- * Hemocitómetro (cámara de Neubauer)
- * Pipetas Pasteur estériles
- * Puntas de micropipetas estériles
- * Solución balanceada de Hank's
- * Suero fetal de ternera (Gibco)
- * HEPES (Sigma)
- * Cloxacilina
- * Ampicilina

- * Gentamicina
- * Agar sangre (Agar sangre, base N°2, Oxoid)
- * Agar Sabouraud maltosa (Oxoid)

7.2. PREPARACION DEL MEDIO DE MANTENIMIENTO DE LAS CELULAS PERITONEALES

Solución balanceada de Hank's	900 ml
Suero fetal de ternera	100 ml
HEPES	2,143 g
Cloxacilina	90 mg
Ampicilina	90 mg
Gentamicina	4,5 mg

El medio era preparado según De la Fuente (212), ajustado a pH 7,2 y guardado en alícuotas de 4ml a -20°C. Se escogían 2 alícuotas al azar y se verificaba en agar sangre a 37°C y en medio de Sabouraud maltosa, a temperatura ambiente, la no contaminación por bacterias u hongos.

7.3. PROCEDIMIENTO

Las células peritoneales se ajustaron, de acuerdo con su proporción en macrófagos, obtenida en estudios previos, a una concentración de $5 \cdot 10^5$ macrófagos/ml en el medio de cultivo, según el método de De La Fuente (212).

Se midió su viabilidad celular con azul de tripano, usándose sólo las suspensiones celulares que tuvieron una viabilidad superior al 95%. Cuando los hematíes superaron el 5% de las células peritoneales se hemolizaron, según el método descrito anteriormente (207).

Se añadieron 200 μ l de la suspensión celular a las placas MIF plástico, relizándose para cada ratón 3 pruebas y obteniéndose la media. Se mantuvieron a 37°C durante 2 horas, en ambiente húmedo.

Los discos se lavaron 3 veces con Hank's frío, según el método descrito por Mosier (208), y el número de células recuperadas se midió en una cámara Neubauer, haciéndose 2 recuentos por cada placa de adherencia, y hallándose su media.

El **Índice de adherencia** se calculó según la fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ inicial de células} - \text{N}^\circ \text{ de células del sobrenadante}}{\text{N}^\circ \text{ inicial de células}} * 100$$

Este índice, que representaba la adherencia de la población peritoneal, se ajustó después para la población macrofágica, según su proporción en la población peritoneal.

Se realizó también la medida de la viabilidad celular, por exclusión de azul de tripano, de cada placa de adherencia, que nos garantizó el buen estado de las células al finalizar el experimento. También, se testó en agar sangre, la no contaminación bacteriana de las placas.

8. ESTUDIO DE LA QUIMIOTAXIS Y MOVILIDAD ESPONTANEA DE LAS CELULAS PERITONEALES

Se eligió para medir tanto la quimiotaxis como la movilidad espontánea, el método de Boyden modificado (213). Realizamos la técnica en cámaras, de las denominadas de vaso ciego, que tienen dos compartimentos separados por un filtro con poros, que permiten el movimiento quimiotáctico y al azar de las células, pero no su caída de un compartimento al otro. En el piso superior se colocaron las células y en el inferior la sustancia quimiotáctica o el medio en el que se preparaba ésta, según midiéramos quimiotaxis o movilidad espontánea. Las células emigraron a través de los poros hacia el compartimento inferior. La prueba se paró por la fijación del filtro y su tinción.

8.1. MATERIAL

- * Cámara de flujo laminar
- * Estufa a 37°C
- * Tubos de centrifuga siliconizados
- * Cámaras de vaso ciego (Neuro Probe, Quimigranel)
- * Filtros de microporo de policarbonato, 5µm de diámetro (Nuclepore, Quimigranel)
- * Tubos de plástico estériles, 5 ml
- * Hemocitómetro (cámara de Neubauer)
- * Pipetas Pasteur estériles
- * Puntas de micropipetas estériles
- * Tiras pH (Merck)
- * RPMI-1640 (Sigma)
- * Albúmina Bovina, libre de ácidos grasos (Sigma)
- * HEPES (Sigma)
- * Caseína (Sigma)
- * Agar sangre (Agar sangre base N° 2, Oxoid)
- * Agar Sabouraud maltosa (Oxoid)

8.2. PROCEDIMIENTO DE SILICONIZADO

Solución de silicona	15 ml
Agua destilada	985 ml

Los tubos de vidrio limpios y secos se sumergieron en este líquido durante 24

horas, a temperatura ambiente. Se secaban en la estufa, puestos bocabajo, durante una mañana. Se esterilizaron tapados con algodón en horno Pasteur a 140°C, durante un tiempo de 3 horas.

8.3. PREPARACION DEL MEDIO DE MANTENIMIENTO DE LAS CELULAS PERITONEALES

RPMI-1640	100 ml
Bicarbonato sódico	0,2 g
HEPES	0,2383 g
Albúmina bovina	2 g

Se ajustaba con ácido clorhídrico 0,1 N a pH 7. Se hicieron alícuotas y se guardaban a -20°C. Se escogían al azar 2 alícuotas y se verificaba en agar sangre, a 37°C, y en agar Sabouraud maltosa, a temperatura ambiente, durante 1 semana la no contaminación por bacterias u hongos.

8.4. PREPARACION DE LA SUSTANCIA QUIMIOTACTICA

RPMI-1640	15 ml
Bicarbonato sódico	30 mg
HEPES	35,8 mg
Caseína	45 mg

Se realizó mediante una modificación del método descrito por Wilkinson (214), que consistió en el cambio del medio de cultivo Medium 199 por RPMI-1640. Se subió el pH del RPMI-1640 a 12 con hidróxido sódico 0,1M. Se añadió la caseína y se acidificó el pH con ácido fosfórico 0,1M. Cuando el pH era de 8 se añadió el bicarbonato sódico y el HEPES y se terminó de ajustar, con el ácido fosfórico, a pH 7,2. Se hicieron alícuotas y se guardaron a -20°C.

Se escogían al azar 2 alícuotas y se verificaba la no contaminación bacteriana o fúngica en cultivos de agar sangre y medio de Sabouraud maltosa.

8.5. PROCEDIMIENTO DE LA QUIMIOTAXIS

Se realizó según una modificación del procedimiento descrito por Lohr y Snyderman (215), en cuanto a la sustancia quimiotáctica. Se empleó como quimioatrayente caseína.

Se preparó la suspensión celular en el medio de mantenimiento, a una concentración de 2×10^6 macrófagos/ml.

Se añadieron 100 μ l de la sustancia quimiotáctica a la parte inferior de 3 cámaras de quimiotaxis.

Se colocaron los filtros y se enroscó la parte superior de la cámaras. En el compartimento superior se colocaron 200 μ l de la suspensión celular.

Se incubaron las cámaras a 37°C, en presencia de humedad, durante 4 horas.

Se aspiró, cuidadosamente, la suspensión celular del compartimento superior. Se midió su pH, su viabilidad y la no contaminación bacteriana o fúngica.

Se recogieron los filtros y se colocaron invertidos sobre un cubreobjetos, de modo que las células emigradas quedaban en contacto con el aire. Se dejaron secar durante un tiempo de 50 a 60 minutos.

Se tiñeron mediante el preparado comercial Diff-Quik^R, se colocaron los filtros en un portaobjetos y se cubrieron. Se contaron las células mononucleares emigradas a la cara inferior del filtro en 10 campos elegidos al azar, con objetivo de inmersión. Se hicieron 2 lecturas de cada filtro y el resultado se expresó como la media de la suma de células de la línea monocito-macrofágica emigradas en los 10 campos (**Indice quimiotáctico**).

8.6. PROCEDIMIENTO DE LA MOVILIDAD ESPONTANEA

Se añadieron 100 μ l de RPMI-1640 con HEPES en la parte inferior de 3 cámaras.

Se colocó el filtro y se añadieron 200 μ l de la suspensión celular, a una

concentración de $2 \cdot 10^6$ macrófagos/ml, a la parte superior de la cámara. Se incubaron a 37°C y en presencia de humedad, durante 4 horas.

La fijación de las células emigradas, su tinción y lectura se realizaron como en el caso de la quimiotaxis.

9. ESTUDIO DE LA OPSONIZACION, FAGOCITOSIS Y PODER CANDIDICIDA

La fagocitosis es uno de los más importantes mecanismos de defensa del huésped frente a los microorganismos que lo invaden, siendo el macrófago una de las principales células que participan en ella.

El proceso de la fagocitosis puede separarse en varias etapas: opsonización del microorganismo por factores séricos, adhesión de los microorganismos opsonizados a la superficie del fagocito, englobamiento y muerte intracelular de los microorganismos y su posterior digestión.

Ante la posible alteración de estas funciones por la exposición al plomo, se realizó su estudio.

Se eligió un ensayo *in vitro* frente a *C. albicans*, según modificación del método de Zeligs (216), empleando 2:1 *Candidas* por macrófago.

9.1. MATERIAL

- * Tubos de centrifuga siliconizados, estériles
- * Pipetas Pasteur estériles
- * Puntas amarillas de micropipeta, estériles
- * Agitador de tubos (Reax 2000, Heidolph)
- * Centrifuga (Janetzki T 32 c)

- * Baño con agitación (Baño Unitronic 320 OR, Selecta)
- * Azul de trípano 0,4% (Merck)
- * Azul de metileno 0,1%
- * RPMI-1640
- * Suero fetal de ternera (Gibco)
- * HEPES (Sigma)
- * *C. albicans*
- * Células peritoneales
- * Agar sangre (Agar sangre, base N° 2, Oxoid)
- * Agar Sabouraud maltosa (Oxoid)

9.2. PREPARACION DEL MEDIO DE MANTENIMIENTO DE LAS CELULAS PERITONEALES

RPMI-1640	1000 ml
Bicarbonato sódico	2 g
HEPES	2,383 g

Se ajustaba el pH a 7,2 y se preparaban alícuotas de 4 ml en jeringuillas estériles y de 2 ml en tubos de plástico también estériles. Se guardaban en el congelador a -20°C y se elegían al azar 2, verificándose en agar sangre y en agar de Sabouraud, la no contaminación por bacterias u hongos.

9.3. PREPARACION DEL MEDIO PARA OPSONIZACION DE *Candida albicans*

RPMI-1640	80 ml
Bicarbonato sódico	160 mg
HEPES	90,4 mg
Suero fetal de ternera	20 ml

El suero fetal era previamente descomplementado, a 56°C durante 30 minutos. Se

hacían alícuotas de 2 ml y se guardaban en el congelador a -20°C . Se comprobaba en agar sangre y en Sabouraud maltosa la no presencia de bacterias y hongos.

9.4. PREPARACION DE LA CEPA DE *C. albicans*

Se utilizó una cepa de *C. albicans*, cedida por el laboratorio de Microbiología del Hospital Militar Central Gómez Ulla. Se perpetuó la cepa de *C. albicans* por cultivo en agar de Sabouraud maltosa que se renovó cada 3 días. Se usaron siempre cultivos de 18 a 20 horas, para evitar la formación de hifas y la presencia de levaduras en estado de gemación. Se preparó una alícuota en el medio de opsonización a una concentración *C. albicans* de $4 \times 10^6/\text{ml}$ y se incubó 30 minutos a 37°C en un baño con agitación de 60 rpm. Una segunda alícuota se preparaba en PBS y se medía su viabilidad con azul de metileno al 0,1 % (217). Sólo se usaron las suspensiones con una viabilidad superior al 99%. Las suspensiones se conservaron a 4°C hasta su uso para la opsonización o la medida de la viabilidad.

9.4.1. Procedimiento

La suspensión celular se ajustó a una concentración de 2×10^6 macrófagos/ml en el medio de mantenimiento. Se midió su viabilidad celular, por exclusión de azul de trípáno, usándose suspensiones con la viabilidad superior al 95%. Se hicieron 2 alícuotas con 0,25 ml de la suspensión en cada tubo. Se cultivó una tercera alícuota en agar sangre a 37°C , durante 1 semana, para comprobar la no contaminación de la suspensión celular .

Inmediatamente después se añadieron 0,25 ml de la suspensión de *C. albicans*, que había sido previamente opsonizada, según se mencionó anteriormente.

Se mantuvo a 37°C en un baño con una agitación de 60 rpm, durante un tiempo de 120 minutos, que la estandarización previa nos mostró como el más adecuado.

Cuando faltaban 5 minutos para los 120, se obtenía una alícuota y se medía la viabilidad de las células peritoneales con azul de tripano al 0,4%. Al resto se añadía azul de metileno al 0,1%.

Se centrifugaban los tubos a 1750 rpm durante 10 minutos. Se decantaba el sobrenadante y con la punta de una micropipeta se resuspendía y se tomaba una muestra que se miraba con objetivo de 40* en un hemocitómetro, contándose un mínimo de 200 células peritoneales.

Se usaban suspensiones controles de *C. albicans* en el medio de opsonización e igual volumen de medio de mantenimiento de macrófagos pero sin fagocitos, para medir la viabilidad de las *C. albicans* durante el ensayo.

Se obtuvieron los siguientes índices:

* **Índice fagocítico:** Número de células con *C. albicans* ingeridas/100 macrófagos.

* **Número medio de *C. albicans* por macrófago con *C. albicans*.**

* **Número de macrófagos con *C. albicans* adheridas/100 macrófagos.**

* **Índice candidicida:** Número de *C. albicans* fagocitadas y muertas/100 macrófagos.

Se contaban 200 células peritoneales y se calculaban los anteriores índices según el porcentaje de macrófagos de la población peritoneal.

10. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos recogidos sobre los efectos de la exposición en las diversas variables dependientes, se analizaron en un primer estadio según los parámetros de la estadística descriptiva: media y desviación típica.

En un segunda fase se emplearon los métodos de la estadística analítica necesarios en cada estudio para la comparación de los datos en los distintos grupos.

En las pruebas de estandarización, que requerían la comparación de los resultados de 2 grupos, el análisis se realizó mediante la prueba t de Student. Se consideraron significativas las diferencias con una $p \leq 0,05$ y cuando las diferencias eran significativas se estimó la magnitud de la diferencia mediante un intervalo de confianza (218). Cuando los supuestos de normalidad o de igualdad de varianzas no se cumplieron se empleó la prueba U de Mann-Whitney (218).

La comparación de los resultados entre el grupo control y los expuestos a 13, 130 y 1300 ppm, se hizo mediante el análisis de la varianza, rechazándose la hipótesis nula cuando la $p \leq 0,05$. Para explorar los grupos que producían las diferencias se utilizaron comparaciones múltiples mediante "contrastes a posteriori", según la prueba de Scheffé (219). Cuando las condiciones de normalidad y de homogeneidad de varianzas no se cumplieron, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (219).

En el caso de que la modificación de la variable dependiente se relacionara con el progresivo aumento de la dosis, se utilizó el método de la regresión lineal simple (220).

IV. RESULTADOS

1. ESTANDARIZACION DE LAS TECNICAS

En un primer estadio se comprobó la fiabilidad de la exposición al plomo a través de la vía oral, por medio de la bebida, registrándose la ganancia de peso semanal de los ratones y su peso final, indicadores de un buen estado general y de la intoxicación subclínica. También se estandarizaron las diferentes técnicas.

1.1. ESTUDIO DE LA VALIDEZ DE LA EXPOSICION AL PLOMO A TRAVES DE LA BEBIDA

Se emplearon 40 ratones hembras Balb/c de 4 semanas de edad, constituyéndose 4 grupos experimentales de 10 ratones cada uno: el control y los expuestos a 13, 130 y 1300 ppm. La comparación en los resultados se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

El consumo medio de agua por ratón se midió semanalmente durante 70 días. Se calculó la ingesta media diaria de líquido de cada ratón, que se representa en la Tabla I.

Al comparar el consumo medio de líquido de los animales expuestos a los diferentes grupos de intoxicación y de los controles no se obtuvieron diferencias significativas (ANOVA $p=0,35$). El consumo medio de agua de los animales estaba entre 3,95 y 4,34 ml al día.

1.2. RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO DE LOS RATONES DURANTE EL ESTUDIO PILOTO

El desarrollo ponderal fue semejante en todos los grupos y durante las 10 semanas de exposición al plomo, como se representa en la Figura 1.

La ganancia de peso total también era similar (ANOVA $p=0,59$) en todos los grupos: $7,24 \pm 0,49$ g en los controles, $7,31 \pm 1,91$ g en el grupo de 13 ppm, $7,78 \pm 0,46$ g en el de 130 ppm y $7,82 \pm 2,97$ g en el de 1300 ppm.

La comparación del peso final de los ratones dió también diferencias no significativas (ANOVA $p=0,54$), siendo de $19,9\pm 1,02$ g, $19,9\pm 1,4$ g, $20,6\pm 1,89$ g y de $20,7\pm 1,84$ g, para los animales testigo y los expuestos a 13 ppm, 130 ppm y 1300 ppm respectivamente.

1.3. ESTANDARIZACION DE LA OBTENCION DE LAS CELULAS PERITONEALES

1.3.1. Diseño experimental

Se utilizaron 24 ratones hembras Balb/c de 8 a 12 semanas de edad.

En 12 ratones se inyectó en el centro de la línea media abdominal un volumen de 2 ml de Hank's y en los otros 12 un volumen de 4 ml.

Se recogió el fluido peritoneal mediante aspiración, se centrifugó y se calculó su recuento celular medio en cámara Neubauer.

La comparación de los resultados se realizó mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, porque no se cumplió la condición de normalidad.

1.3.2. Resultados

La Figura 2 representa el número medio de células peritoneales, obtenidas tras la inyección de 2 y 4 ml de medio de mantenimiento en peritoneo.

El lavado de peritoneo con 4 ml de medio de mantenimiento obtenía el 154,8% de células más que cuando se realizaba con 2 ml. Las diferencias fueron significativas (U de Mann-Whitney $p= 0,001$), por lo que elegimos la inyección con 4 ml para todos los experimentos realizados posteriormente.

1.4. ESTANDARIZACION DE LA RECUPERACION DE LAS CELULAS PERITONEALES ADHERIDAS AL PLASTICO

1.4.1. Diseño experimental

Se emplearon 13 ratones con una edad comprendida entre las 8 y las 12 semanas.

Se obtuvieron sus células peritoneales y se estudió la recuperación media de éstas tras la adherencia a placas MIF de plástico, dependiendo del uso de concentraciones celulares iniciales de 2.000.000/ml o de 1.000.000/ml y de su tratamiento con un choque térmico, o de una concentración inicial de 2.000.000/ml y la utilización de tripsina para despegarlas.

Se realizaron 3 pruebas por ratón y el resultado se expresó mediante la media y la DE. También se midió la viabilidad celular con azul de tripano, según el método de recuperación. Se utilizaron 5 y 5 ratones para comparar las dos concentraciones celulares usadas para el método del choque térmico y 3 ratones para el método de la tripsina.

Se analizaron los resultados obtenidos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para el número de células recuperadas y ANOVA para la viabilidad celular.

1.4.2. Resultados

En la Tabla II se muestran la media y DE de las células peritoneales recuperadas después de la adherencia a placas MIF de plástico.

El uso de 1.000.000 de células y de un choque térmico permitía recuperar un 105,65% del empleo de 2.000.000 de células y un choque térmico y un 122,5% del uso de tripsina.

Este porcentaje medio de células recuperadas fue el mismo, con una gran dispersión de los resultados, con independencia del método utilizado. Por ello su análisis se realizó mediante una prueba no paramétrica, la prueba de Kruskal Wallis $p=0,5$.

La viabilidad celular tampoco mostró diferencias significativas (ANOVA $p=0,84$), siendo de $82 \pm 9,7$ para el grupo de 2.000.000 de células de partida y choque térmico, de $81 \pm 10,59$ para el de 1.000.000 y choque térmico, y de 82 ± 3 para el de 2.000.000 y tripsina.

1.5. ESTANDARIZACION DE LA DIFERENCIACION CELULAR PERITONEAL

En este experimento trabajamos con 12 ratones hembras Balb/c de 8 a 12 semanas de edad.

Debido al escaso número de macrófagos aislados por la adherencia y posterior despegamiento, insuficientes para la realización del resto de las técnicas, decidimos conocer el porcentaje monocito-macrofágico en las células peritoneales y realizar la corrección, según esta proporción, en las células obtenidas para la verificar las técnicas con el número de macrófagos adecuados. Empleamos la técnica de May-Grunwald-Giemsa para la diferenciación celular.

La diferenciación celular nos mostró una población peritoneal del 32% de macrófagos, 0,33% de células NK, 65,75% de linfocitos, 1,33% de polimorfonucleares, 0,25% de eosinófilos y 0,34% de basófilos.

1.6. ESTANDARIZACION DEL INDICE DE ADHERENCIA DE LAS CELULAS PERITONEALES

1.6.1. Diseño experimental

Se utilizaron 6 ratones hembras Balb/c con una edad de 8 a 12 semanas. Se empleó como **Índice de adherencia** el porcentaje de células peritoneales adheridas a placas MIF, según el protocolo mencionado anteriormente, usándose 3 placas para cada ratón y valorándose el resultado medio. Se calculó además el **Índice de adherencia** de la población monocito-macrofágica a partir del índice anterior y de la proporción de esta línea en las células peritoneales.

También se midieron la viabilidad celular inicial y la final, con azul de tripano.

1.6.2. Resultados

La media del porcentaje de adherencia de las células peritoneales fue de $32,8 \pm 6,72$.

El **Índice de adherencia** de los macrófagos era de $93,9 \pm 9,7$.

Las viabilidades inicial y final de las células fueron $98 \pm 0,61$ y $97 \pm 1,11$ respectivamente.

1.7. ESTANDARIZACION DE LA QUIMIOTAXIS Y MOVILIDAD ESPONTANEA

1.7.1. Diseño experimental

Se utilizaron 12 ratones hembras Balb/c con edades entre las 8 y las 12 semanas de edad, a los que se dividió en 2 grupos.

En el primer grupo, compuesto por 7 ratones, se usó como sustancia quimiotáctica la caseína a una dosis de 5 mg/ml y en el segundo, formado por 5 ratones, esta misma sustancia a una dosis de 3 mg/ml. En las prueba de movilidad espontánea la sustancia control fue RPMI-1640. Se realizaron 3 pruebas de quimiotaxis y 3 de movilidad espontánea para cada ratón, según la técnica de Boyden. Se valoró el número de células de la línea monocito-macrofágica que emigraron a la cara inferior de una membrana de policarbamato. También se midieron las viabilidades inicial y final de las células utilizadas en el experimento.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student y como ésta resultó significativa se estimó el intervalo que expresa la magnitud de la diferencia.

1.7.2. Resultados

En la Tabla III se representa el **Índice quimiotáctico**, es decir el número medio de células emigradas a la cara inferior del filtro, con las 2 dosis de caseína (Figura 3).

La dosis de 3 mg/ml de caseína produjo un paso de células de la línea monocito-macrofágica del 190,7% del uso de 5mg/ml de caseína. Las diferencias fueron altamente significativas ($p=0,0009$) por lo que elegimos la dosis de 3 mg/ml para la realización de experimentos posteriores. El uso de 3 mg/ml de caseína permitía el paso de 10,36 a 29,61 células más que la dosis de 5 mg/ml, con un intervalo de confianza del 95%.

La movilidad espontánea, fue semejante, no mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p=0,14$) (Figura 3).

La viabilidad inicial y la final de las células durante la realización del experimento fueron $98 \pm 0,85$ y $97,5 \pm 0,87$ respectivamente.

1.8. ESTANDARIZACION DE LA OPSONIZACION, FAGOCITOSIS Y PODER CANDIDICIDA DE LAS CELULAS PERITONEALES

1.8.1. Diseño experimental

En este experimento trabajamos con 12 ratones hembras Balb/c de 8 a 12 semanas de edad.

Se incubaron sus macrófagos peritoneales con *C. albicans*, siguiendo la metodología ya mencionada en el apartado de material y métodos, y obteniéndose los índices referidos en dicho apartado. Se utilizaron 6 ratones durante un periodo de 90 minutos y 6 ratones durante 120 minutos.

La comparación de medias se hizo con la prueba t de Student. Cuando las diferencias con la t de Student fueron significativas se estimaron las magnitudes de las diferencias.

1.8.2. Resultados

En la Tabla IV se recoge el **Índice fagocítico**, esto es el número de macrófagos con *C. albicans* fagocitadas, a los 90 y 120 minutos. Este índice realizado a los 120 minutos era un 193,4% del índice a los 90 minutos.

La comparación demostró diferencias estadísticamente significativas con una $p=0,016$. El intervalo de confianza para el 95% del **Índice fagocítico** a los 120 minutos respecto al de los 90 minutos era de 5,91 a 46,57 veces mayor.

El **Número medio de *C. albicans* por fagocito** fue de $1,08 \pm 0,20$ para un tiempo de 90 minutos y de $1,31 \pm 0,08$ (121,3% del anterior) para los 120 minutos, no siendo estadísticamente significativos ($p=0,11$).

El **Número de macrófagos con *C. albicans* adheridas** era de $19,16 \pm 10,43$ y de $13,01 \pm 9,44$ (67,9% de las *C. albicans* adheridas en un tiempo de 90 minutos), respectivamente, no diferenciándose estadísticamente ($p=0,42$).

El **Índice candidicida** de los macrófagos se representa en la Figura 4, siendo las diferencias muy significativas ($p=0,0052$). El **Índice candidicida** a los 120 minutos era de 11,95 a 51,79 más células que a los 90 minutos, con un intervalo de confianza del 95%.

Ante estos resultados elegimos los 120 minutos como el tiempo más adecuado para la realización de la prueba.

2. MODELO MURINO DE EXPOSICION AL PLOMO

Ya que se pretendió demostrar que es la exposición a dosis subclínicas de plomo la que altera diversas funciones de los macrófagos, se midieron el peso final y la ganancia total de peso, así como el consumo medio diario de agua, como control tanto del buen estado de los animales ante una intoxicación subclínica, como de la validez de la exposición oral a este metal a través de la bebida.

Durante la realización de este trabajo de experimentación se emplearon 3 series diferentes de ratones asignados a los grupos testigo y a los expuestos a 13, 130 y 1300 ppm de acetato de plomo. Se muestran las estadísticas descriptiva y analítica del peso final, de la ganancia de peso y del consumo de agua de estos ratones, delante de las diferentes técnicas empleadas con cada serie de animales.

2.1. PARAMETROS GENERALES DEL BUEN ESTADO DE LOS ANIMALES

Esta serie estaba formada por 40 animales, 10 por cada grupo. La exposición de los ratones al metal se realizó durante 70 días, periodo en el cual se pesó a los animales semanalmente y se midió el consumo de líquido, que se expresó en mililitros/día.

La comparación de los resultados entre los diferentes grupos se ha realizado mediante la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) y cuando no se han cumplido las condiciones para su aplicación con el "test" no paramétrico de Kruskal-Wallis.

2.1.1. Resultados en el peso final

La Tabla V recoge el peso final, en gramos, de los diferentes grupos.

La comparación de los pesos de los 4 grupos no dió diferencias significativas en el peso final. La prueba ANOVA dió una $p=0,71$.

2.1.2. Resultados en la ganancia de peso

El desarrollo ponderal de los ratones fue semejante a lo largo de todo el periodo, aunque durante la fase de ganancia rápida de peso (de la 2ª a la 4ª semana de exposición) la gran dispersión de los datos nos obligó a analizarlos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

La ganancia de peso total, durante las 10 semanas, fue de $7,52 \pm 1,75$, $7,84 \pm 2,08$, $7,86 \pm 1,98$ y $8,22 \pm 1,63$ g para los ratones testigo y los expuestos a 13 ppm, 130 ppm y 1300 ppm de plomo. Estas ganancias de peso fueron semejantes (ANOVA $p=0,87$).

2.1.3. Consumo medio de agua al día

En la Tabla VI se muestra el consumo medio diario de agua.

El consumo medio de agua al día no variaba, independientemente del grupo al que pertenecieran los ratones. Esta comparación fue realizada mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y dió una $p=0,58$.

2.2. PLOMO RENAL

Se escogió al riñón como indicador de la exposición al plomo, ya que es órgano diana del plomo, interviene en su metabolismo y acumula metal.

2.2.1. Diseño experimental

Se utilizaron los 40 ratones hembras Balb/c, ya mencionados, distribuidos aleatoriamente en un número de 10 para cada grupo.

Cuando terminó el periodo de 70 días de exposición, se sacrificaron y se extrajeron y pesaron sus riñones. Se valoró la proporción del peso renal respecto al peso corporal total. Se midió el plomo renal en ppb y corrigió esta medida respecto al peso del riñón mediante la razón de los μg de metal/g de peso renal seco (liofilizado previamente a la determinación).

2.2.2. Resultados

El peso renal, medido en gramos, fue semejante en los 4 grupos. En el grupo control fue de 0,037 g, siendo un 101,8% de éstos para los intoxicados con 13 ppm, un 106,4% para los animales de 130 ppm y un 105,6% para aquéllos de 1300 ppm. La comparación mediante el análisis de la varianza dió una $p=0,67$.

La proporción del peso renal respecto al peso total fue de $0,0018 \pm 0,0001$, $0,0018 \pm 0,0002$, $0,0019 \pm 0,0001$, $0,0019 \pm 0,0002$ para los ratones testigo y los expuestos a 13 ppm, 130 ppm y 1300 ppm respectivamente. El análisis de la varianza dió una

$p=0,12$.

En la Figura 5 se representa el contenido renal en plomo en ppb. La concentración del plomo renal aumentaba en un 458,8% respecto al control en el grupo de 13 ppm, en un 1388,6% en el sometido a 130 ppm y en un 7041,3% en el expuesto a 1300 ppm. La comparación del contenido en este metal se realizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0000000561$).

En la Tabla VII se muestra el contenido en plomo renal corregido respecto al peso del riñón liofilizado. Las diferencias entre los grupos en el contenido en plomo corregido por el peso renal aumentaban sobre las realizadas previamente a la corrección. El análisis de estos resultados, realizado también mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis dió un $p=0,0000000563$.

Se intentó establecer si había una relación lineal entre la dosis de exposición al plomo y su contenido renal. Para ello se realizó un análisis de regresión lineal simple en el que la dosis de plomo era la variable independiente y el contenido de plomo del riñón en ppb la variable dependiente (Figura 6). Se podía obtener el contenido en plomo renal a partir de la dosis de metal bebida mediante la recta $y=21,12+0,276x$, con una $p<0,0001$. Su coeficiente de correlación (r) era igual a 0,9898. La dosis de exposición al plomo explicaba un 97,96% del contenido en metal, en ppb, del riñón.

La recta de regresión para el contenido en plomo, en $\mu\text{g/g}$ renal, a partir de la dosis de exposición (Figura 7) era $y=5,48+0,071x$, con un coeficiente de correlación de 0,9897 y una $p<0,0001$. Un 97,95% del plomo en $\mu\text{g/g}$ renal procedía de la dosis bebida.

2.3. CUADRO HEMATICO

En este apartado se valora el estado del sistema sanguíneo, en una exposición subclínica al plomo, durante un tiempo de 10 semanas. Se realizaron los recuentos de glóbulos rojos y blancos, así como las fórmulas leucocitarias, en 10 ratones en cada uno

de los grupos el control y los expuestos a 13, 130 y 1300 ppm.

2.3.1. Resultados

La media de hemáties/ μ l fue de $6.458.840 \pm 262.053$ en el grupo testigo y de $6.538.290 \pm 534.515$, $6.944.330 \pm 863.682$ y $6.732.190 \pm 387.964$ en los grupos expuestos a 13 ppm, 130 ppm y 1300 ppm de metal. La comparación, realizada mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, mostró que las diferencias observadas no eran significativas ($p=0,45$).

La Tabla VIII y la Figura 8 muestran el efecto del plomo sobre el recuento de leucocitos en sangre periférica de ratón, después de 10 semanas de exposición al metal.

El número de leucocitos aumentaba a un 111,6% del control en el grupo expuesto a 130 ppm, permaneciendo prácticamente igual para los animales de los grupos de 13 y 1300 ppm. Su comparación no dió diferencias significativas (ANOVA $p=0,88$).

Los resultados de la fórmula leucocitaria, analizados mediante la prueba X^2 , fueron semejantes ($X^2=0,5333$ $p=0,99$).

El número de neutrófilos fue de $990,6+596,2$, 1241 ± 568 , 1050 ± 455 y $744,5 \pm 474$ para los animales controles y los expuestos a 13, 130 y 1300 ppm, respectivamente. Su análisis mostró que los resultados eran semejantes (ANOVA $p=0,23$).

Los linfocitos fueron de $4818,9 \pm 1992$ en el grupo testigo, $5220,4 \pm 1384$ en el grupo de 13 ppm, $5933,3 \pm 2095$ en el grupo de 130 ppm y de 5465 ± 2519 en el grupo de 1300 ppm. El análisis de estos resultados, realizado mediante la prueba ANOVA, dió que las diferencias no eran estadísticamente significativas ($p=0,67$).

Los monocitos fueron de $157,7 \pm 100$, 196 ± 131 , $96,8 \pm 95$ y $118,3 \pm 82,3$ para los ratones testigo y sometidos a 13, 130 y 1300 ppm, respectivamente. Estos resultados no diferían estadísticamente (ANOVA, $p=0,18$).

2.4. NUMERO DE CELULAS PERITONEALES

2.4.1. Diseño experimental

En los animales anteriores se obtuvieron las células peritoneales de los ratones y se midieron 4 parámetros diferentes que se podrían modificar por la exposición al plomo: el número, la viabilidad, la composición celular según May-Grunwald y el índice de adherencia.

2.4.2. Resultados

En la Figura 9 quedan reflejados el número de células peritoneales de los diferentes grupos. Se puede observar como eran semejantes excepto para el grupo expuesto a 1300 ppm de plomo que experimentaba un aumento en su número a un 119,36% del control. El análisis de estos resultados, realizado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, puso de manifiesto que eran semejantes ($p=0,39$).

2.5. VIABILIDAD CELULAR

En la Tabla IX representamos los resultados obtenidos en la medida de la viabilidad de las células peritoneales, por la técnica de exclusión celular de azul de tripano.

Los resultados de la viabilidad fueron siempre buenos (mayores del 97%). La comparación de las viabilidades mostró que no había diferencias significativas entre ellas (ANOVA $p=0,50$).

2.6. COMPOSICION CELULAR

En la Figura 11 se muestran las subpoblaciones de células peritoneales.

Los resultados fueron muy semejantes en los 4 grupos. El porcentaje de macrófagos aumentó ligeramente con la exposición al metal, así como el de células NK. La proporción de linfocitos disminuyó cuando se elevaba la dosis de plomo. El análisis de los datos cualitativos, realizado mediante la prueba X^2 , dió que los resultados no eran significativos

con una $p=0,99$.

2.7. INDICE DE LA ADHERENCIA CELULAR

En este apartado investigamos la hipótesis de que la exposición al plomo modificara la función de adherencia de las células del peritoneo, mediante el uso del índice mencionado anteriormente en el material y métodos.

El **Índice de adherencia** del conjunto de células blancas del peritoneo se muestra en la Figura 12. Este índice aumentaba a un 122,6% y a un 115,8% del control en los grupos expuestos a 13 y 130 ppm y experimentaba una gran disminución, a un 55,15% en los animales expuestos a 1300 ppm de plomo. Estas diferencias se analizaron mediante el "test de Kruskal-Wallis", obteniéndose una $p= 0,00044$.

El **Índice de adherencia** de los macrófagos se muestra en la Tabla X, donde se puede observar que aumentaba a un 108,8% de los controles en el grupo de 13 ppm, descendía a un 99% en el sometido a 130 ppm y a un 55,8% en el expuesto a 1300 ppm de metal. El análisis de estos resultados, mediante la prueba análisis de la varianza, mostraba que las diferencias eran estadísticamente significativas con una $p<0,0001$. Realizando la prueba de Scheffé, para "contrastes a posteriori" obtuvimos que el grupo expuesto a 1300 ppm es el que producía la significación estadística, diferenciándose del conjunto de los otros 3 grupos.

La viabilidad celular al finalizar la prueba de la adherencia, medida para garantizar el buen estado de las células, fue siempre superior al 95%. Sus medias fueron de 96,8, 96,6, 97 y 97 para los ratones del grupo control y los sometidos a 13 ppm, 130 ppm y 1300 ppm. Su comparación, por ANOVA, no era estadísticamente significativa ($p=0,7$).

2.8. PARAMETROS GENERALES

2.8.1. Diseño experimental

Se emplearon 29 ratones hembras, singénicos, Balb/c, de 4 semanas \pm 4 días de edad, asignados aleatoriamente al grupo control y a los grupos de exposición a 13, 130 y 1300 ppm de plomo. Estos estaban formados por 6, 9, 8 y 6 animales respectivamente. La intoxicación duró 10 semanas y durante este periodo los ratones se pesaron una vez por semana y también se midió el consumo de agua.

2.8.2. Resultados

El desarrollo ponderal fue semejante en todos los grupos, no produciéndose diferencias significativas en ningún momento, a lo largo de las 10 semanas (Figura 13).

En la Tabla XI se recogen el peso final en gramos, la ganancia total de peso durante el periodo en gramos y el consumo diario de agua en ml.

El peso final de los ratones fue similar en los 4 grupos. Los resultados del mismo, analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, no fueron significativos ($p=0,06$).

La ganancia de peso total de los ratones, analizada mediante ANOVA, fue semejante $p=0,22$.

Tampoco el consumo de agua fue diferente entre grupos (ANOVA $p=0,09$).

2.9. INDICE QUIMIOTACTICO

2.9.1. Diseño experimental

Se pensó que el plomo podría alterar tanto la movilidad celular dirigida por los estímulos químicos (quimiotaxis), como la debida al azar (movilidad espontánea). Las 2 pruebas se realizaron simultáneamente en los mismos animales, 6 ratones en el grupo control y 9, 8 y 6 en los expuestos a 13, 130 y 1300 ppm. Se emplearon 3 cámaras de Boyden para la prueba de quimiotaxis y 3 para la de movilidad espontánea, con cada ratón.

Se hallaron el **Indice quimiotáctico** y el **Indice de movilidad espontánea**, de la forma especificada en el apartado de material y métodos.

También se midieron la viabilidad inicial y final, que si se modificaban podían influir en la movilidad.

2.9.2. Resultados en el Indice quimiotáctico

En la Tabla XII y en la Figura 14 se muestra el **Indice quimiotáctico** en los diferentes grupos.

El **Indice quimiotáctico** descendía a un 65,65% del control en el grupo de 13 ppm, se mantenía (100,7%) en el expuesto a 130 ppm y volvía a disminuir a un 62% en el sometido a 1300 ppm de plomo. La comparación de los resultados, realizada mediante análisis de la varianza, mostró que las diferencias eran significativas ($p=0,038$). Posteriormente se realizó la comparación múltiple de los grupos mediante el uso de "contrastes ortogonales a posteriori", por la prueba de Scheffé. Este análisis estimó que los ratones testigo y los expuestos a 130 ppm diferían de los expuestos a 13 y 1300 ppm de metal, produciendo la significación estadística.

Se analizaron también aquellas condiciones celulares y experimentales, que podrían influir decisivamente en el resultado de la quimiotaxis: la viabilidad celular inicial (indicadora de una posible alteración de la integridad de la membrana), y la viabilidad celular final (señal de las buenas condiciones ambientales).

La viabilidad inicial fue de $98,7 \pm 0,88$ en el grupo control, de $98,94 \pm 1,18$ en el de 13 ppm, de $97,44 \pm 2,19$ en el de 130 ppm y de $99,17 \pm 1,33$ en el de 1300 ppm. Estos resultados eran semejantes (ANOVA $p=0,14$).

La viabilidad final era de $97,82 \pm 1,95$, $97,17 \pm 1,75$, $97,98 \pm 1,90$ y $95,95 \pm 1,19$ para los animales de los grupos testigo, 13 ppm, 130 ppm y 1300 ppm de plomo, respectivamente. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos (ANOVA

p=0,17).

2.10. INDICE DE MOVILIDAD ESPONTANEA

La movilidad espontánea (Tabla XIII, Figura 14) disminuía a un 74,8 % de los animales testigo en el grupo de 13 ppm y a un 71,11% en los ratones de 130 ppm, aumentando ligeramente, a un 91,37%, en los expuestos a 1300 ppm. Estos resultados, analizados mediante análisis de la varianza, eran semejantes (p=0,42).

La viabilidad celular inicial fue la misma que en la quimiotaxis, ya que estas 2 pruebas se realizaron simultáneamente.

La viabilidad celular final fue de $97,03 \pm 2,25$ en los animales controles y de $97,17 \pm 1,39$, $97,94 \pm 1,78$ y $96,36 \pm 1,4$ en los expuestos a 13 ppm, 130 ppm y 1300 ppm, respectivamente. El análisis de estos resultados no dió significación (ANOVA p= 0,41).

2.11. PARAMETROS GENERALES

2.11.1. Diseño experimental

Se utilizaron 24 ratones Balb/c de 4 semanas. Se asignaron aleatoriamente a los grupos control y a las exposiciones a 13 ppm, 130 ppm y 1300 ppm, en un número de 6 por grupo.

Semanalmente se pesaron y se midió su consumo de agua, que se expresó en mililitros diarios.

Cuando terminó la exposición se sacrificó a los ratones. Se lavó su peritoneo con medio de mantenimiento y se incubaron sus células peritoneales con *C. albicans* durante 120 minutos, por duplicado, según el protocolo mencionado anteriormente. Se obtuvieron 4 índices : el **Indice fagocítico**, el **Número medio de *C. albicans* por fagocito**, el **Indice candidicida** y el **Número de macrófagos con *C.albicans* adheridas** por cada 100 fagocitos. También se valoraron la viabilidad inicial y la final de las células y las viabilidades inicial y final de las *C. albicans* utilizadas en los experimentos.

2.11.1. Resultados

En la Tabla XIV recogemos los resultados en la ganancia de peso, peso final y consumo de agua, de los 24 ratones empleados.

El peso final en los distintos grupos, que se analizó mediante ANOVA, puso de manifiesto que las diferencias no eran estadísticamente significativas ($p=0,48$).

En la Figura 15 mostramos la ganancia de peso semanal, durante el periodo de 70 días de exposición al metal. El análisis del desarrollo ponderal, entre los 4 grupos, se realizó mediante ANOVA, salvo en la décima semana, tiempo en el que al no existir homogeneidad de varianzas, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. No hubo diferencias significativas durante este periodo.

La ganancia de peso total fue muy semejante en los 4 grupos (ANOVA, $p=0,73$).

El consumo de agua, que fue analizado mediante la prueba ANOVA, era semejante ($p=0,12$).

2.12. INDICE FAGOCITICO Y NUMERO MEDIO DE CANDIDAS POR MACROFAGO

La viabilidad inicial de las células peritoneales fue siempre superior al 97%: $98,08 \pm 0,66$, $97,66 \pm 0,82$, $97,33 \pm 1,51$ y $97,5 \pm 11,05$, para el grupo control y los grupos de 13, 130 y 1300 ppm de plomo, respectivamente. El análisis estadístico no era estadísticamente significativo (ANOVA, $p=0,65$).

Las viabilidades finales de las células de peritoneo eran de $97 \pm 1,41$ en el grupo testigo, $96,83 \pm 1,47$ en los animales del grupo de 13 ppm, $97,33 \pm 0,82$ en los de 130 ppm y $97 \pm 1,26$ en los de 1300 ppm. El análisis de la varianza demostró que estos resultados eran estadísticamente semejantes (ANOVA $p=0,91$).

Las viabilidades iniciales de las *C. albicans*, medidas por azul de metileno fueron de $99,6 \pm 0,38$, $99,75 \pm 0,27$, $99,63 \pm 0,49$ y $99,6 \pm 0,35$ en los grupos control y expuestos

a 13, 130 y 1300 ppm, respectivamente (ANOVA $p=0,91$).

Las viabilidades finales de las *C. albicans*, eran de $96,5 \pm 1,64$, $97,33 \pm 1,51$, $96 \pm 1,55$ y $96,4 \pm 1,29$, para los animales testigo y los sometidos a 13, 130 y 1300 ppm respectivamente. El análisis de estas viabilidades, realizado mediante la prueba ANOVA, dió un valor de $p=0,49$.

En la Tabla XV y en la Figura 16 se representan los resultados del **Índice fagocítico** y del **Número medio de *C.albicans* por macrófago** respectivamente.

El **Índice fagocítico** no disminuyó, incluso aumentó ligeramente con la exposición al metal. Los resultados no se diferenciaban, según la prueba ANOVA ($p=0,91$).

El **Número medio de *C. albicans* por macrófago** con *C. albicans* descendía con la exposición a un 91,5%, un 82,9% y un 78,94% del control en los grupos de 13, 130 y 1300 ppm de plomo respectivamente. Las diferencias analizadas mediante la prueba ANOVA eran significativas ($p=0,018$). La estimación de estas diferencias, mediante el empleo de "contrastes ortogonales a posteriori" y la prueba de Scheffé, mostró que el conjunto formado por los 3 grupos de exposición al metal se diferenciaba del grupo organizado por el control y las dosis de exposición de 13 y 130 ppm.

2.13. NUMERO DE MACROFAGOS CON *C. ALBICANS* ADHERIDAS

El porcentaje medio de macrófagos con *C. albicans* adheridas fue de $9,23 \pm 1,63$, $9,45 \pm 4,12$, $12,34 \pm 7,6$ y $7,19 \pm 3,98$ para los grupos control y expuestos a 13, 130 y 1300 ppm, respectivamente. Estos resultados eran semejantes (prueba de Kruskal-Wallis, $p=0,55$).

2.14. INDICE CANDIDICIDA

Este índice fue de $33,17 \pm 11,22$ para los macrófagos de los ratones testigo, $34,3 \pm 16,37$ para los del grupo de 13 ppm, $39,9 \pm 8,19$ para los de 130 ppm y $45 \pm 26,06$ para los de 1300 ppm.

El **Índice candidicida** aumentaba con la exposición al metal. Estos resultados, ante la no homogeneidad de sus varianzas, fueron analizados por la prueba de Kruskal Wallis, que dió una $p=0,44$, no siendo por lo tanto estadísticamente significativos.

TABLA I. INGESTA DIARIA DE LIQUIDO EN MILILITROS. PREENSAYO

Grupo	Testigo	13 ppm	130 ppm	1300 ppm
Media	4,36	4,27	3,95	4,02
DE	0,76	0,71	0,18	0,50

TABLA II. CELULAS PERITONEALES RECUPERADAS TRAS ADHERENCIA

	2.000.0000 células Choque térmico	1.000.000 células Choque térmico	2.000.000 células Tripsina
Media recuperada	11,62	12,28	10,02
DE	0,96	7,36	2,02

TABLA III. INDICE QUIMIOTACTICO. ESTANDARIZACION

	3 mg/ml caseína	5 mg/ml caseína
I. quimiotáctico	42,02	22,03
DE	8,94	6,11

TABLA IV. INDICE FAGOCITICO. ESTANDARIZACION

	I. fagocítico t=90	I. fagocítico t=120
Media	28,41	54,95
DE	16,70	14,85

TABLA V. PESO FINAL EN GRAMOS. PRIMERA SERIE

Grupo	Testigo	13 ppm	130 ppm	1300 ppm
Media	20,74	20,70	20,05	21,01
DE	1,97	1,44	2,57	1,19

TABLA VI. CONSUMO DIARIO AGUA EN MILILITROS. PRIMERA SERIE

Grupo	Testigo	13 ppm	130 ppm	1300 ppm
Media	3,69	3,72	3,56	3,66
DE	0,37	0,61	0,23	0,22

TABLA VII. CONTENIDO EN PLOMO CORREGIDO EN $\mu\text{G/G}$

Grupo	Testigo	13 ppm	130 ppm	1300 ppm
Media	1,32	6,58	19,12	97,16
DE	0,48	1,39	4,58	8,50

TABLA VIII. RECUENTO Y FORMULA LEUCOCITOS

Grupo	Leuco N°/ μl	Linfo %	Neutr %	Mono %	Eosi %	Baso %
Testigo	6.401	81,7	15,9	2,4	0	0
13 ppm	6.694	79,2	18,1	2,7	0	0
130 ppm	7.142	82,2	15,2	2,6	0	0
1300 ppm	6.485	83,7	14,5	1,8	0	0

TABLA IX. VIABILIDAD CELULAS PERITONEALES

Grupo	Testigo	13 ppm	130 ppm	1300 ppm
Media	98,05	98,30	97,90	97,75
DE	0,93	0,67	1,02	0,63

TABLA X. INDICE DE ADHERENCIA DE MACROFAGOS

Grupo	Testigo	13 ppm	130 ppm	1300 ppm
Adherencia	85,60	93,13	84,77	47,74
DE	17,12	8,70	23,27	16,50

TABLA XI. PARAMETROS PONDERALES EN GRAMOS Y CONSUMO DE AGUA EN MILILITROS. SEGUNDA SERIE

Grupo	Peso	Ganancia de peso	Consumo de agua
Control	19,72	7,52	4,09
13 ppm	19,02	7,04	4,24
130 ppm	20,90	8,40	4,31
1300 ppm	19,13	7,43	4,04

TABLA XII. INDICE QUIMIOTACTICO

Grupo	Testigo	13 ppm	130 ppm	1300 ppm
Quimiotaxis (Media)	42,19	27,70	42,50	26,14
DE	14,32	7,79	18,55	9,39

TABLA XIII. INDICE DE MOVILIDAD ESPONTANEA

Grupo	Testigo	13 ppm	130 ppm	1300 ppm
Media	26,76	20,02	19,03	24,45
DE	13,79	9,36	9,12	5,39

TABLA XIV. PARAMETROS PONDERALES EN GRAMOS Y CONSUMO LIQUIDO EN MILILITROS. TERCERA SERIE

Grupo	Peso	Ganancia de peso	Consumo de agua
Testigo	18,94	8,95	4,16
13 ppm	18,62	9,05	4,56
130 ppm	18,04	9,01	4,46
1300 ppm	19,19	8,15	4,13

TABLA XV. INDICE FAGOCITICO

Grupo	Testigo	13 ppm	130 ppm	1300 ppm
Media	44,60	46,41	47,33	51,48
DE	9,55	18,43	9,23	25,79

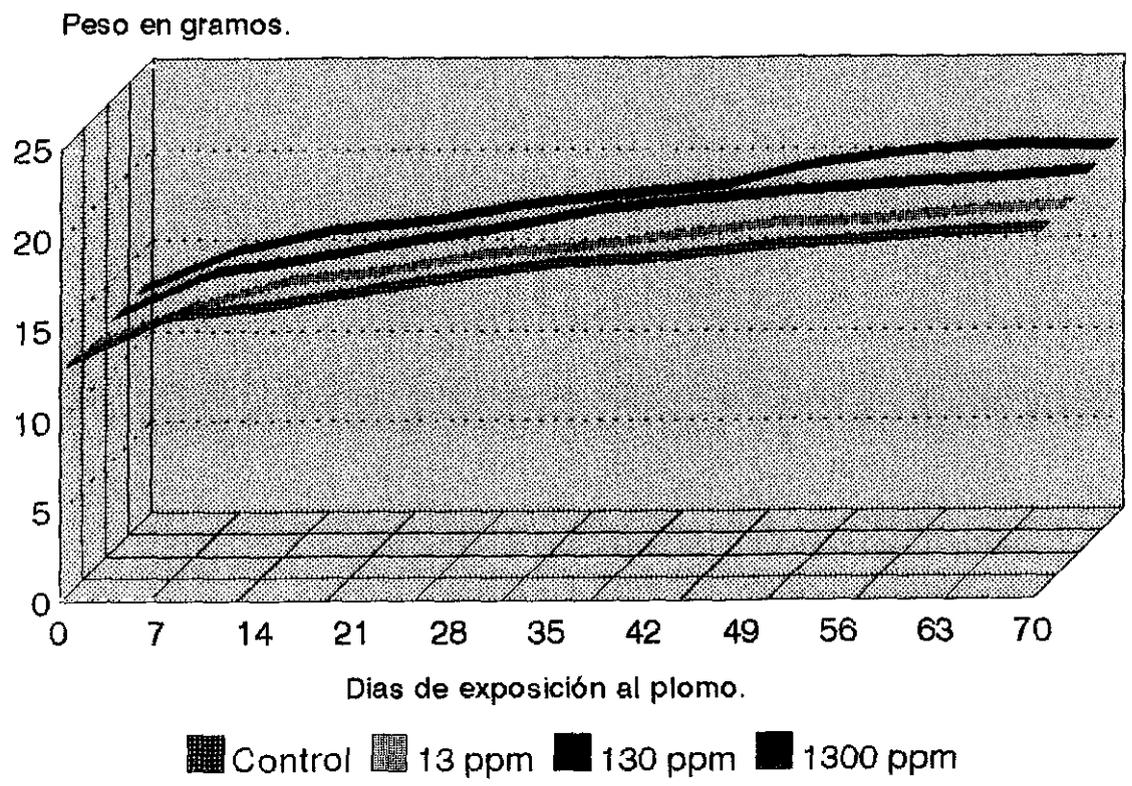


Figura 1. Desarrollo ponderal durante los 70 días de exposición al plomo. Experimento piloto.

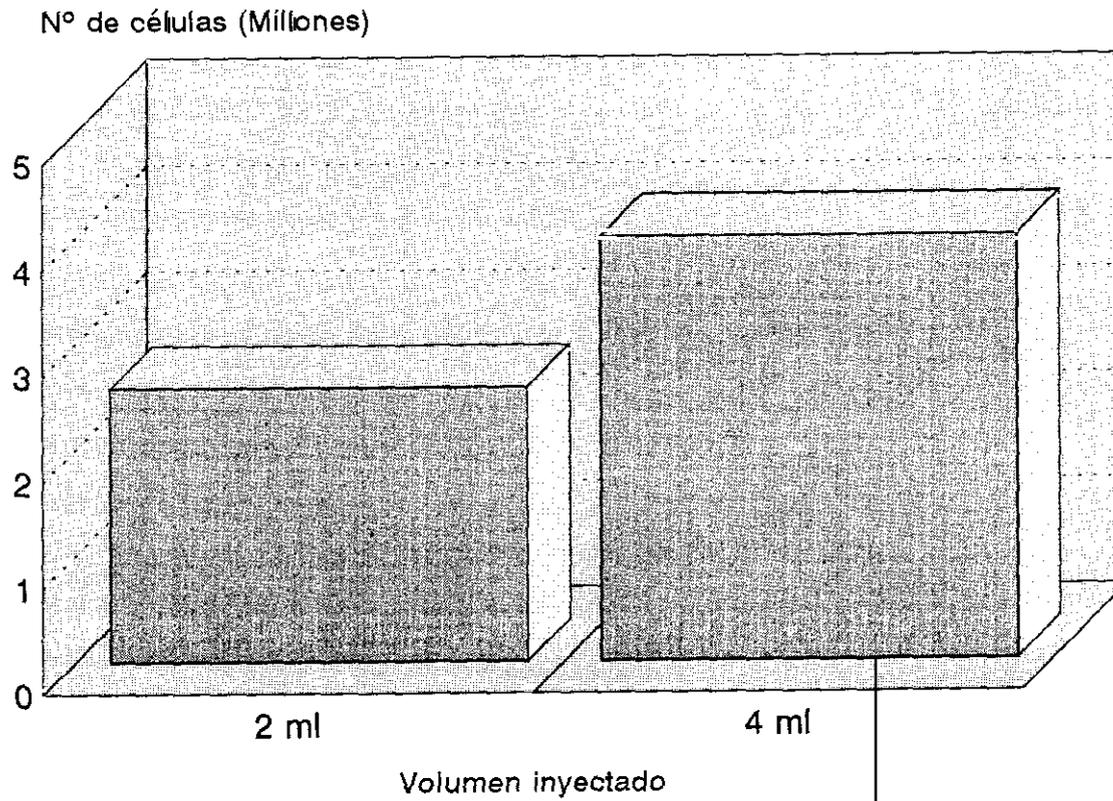


Figura 2. Estandarización de la obtención de células peritoneales

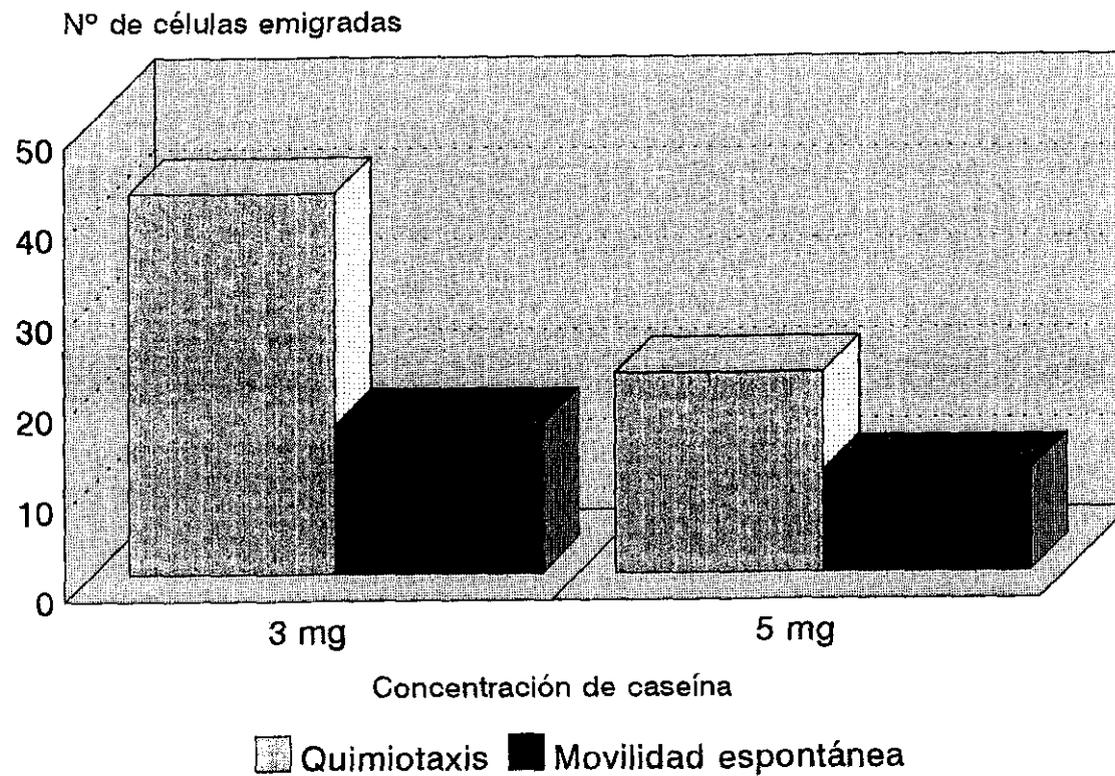


Figura 3. Quimiotaxis y movilidad espontánea con 2 dosis de sustancia quimiotáctica

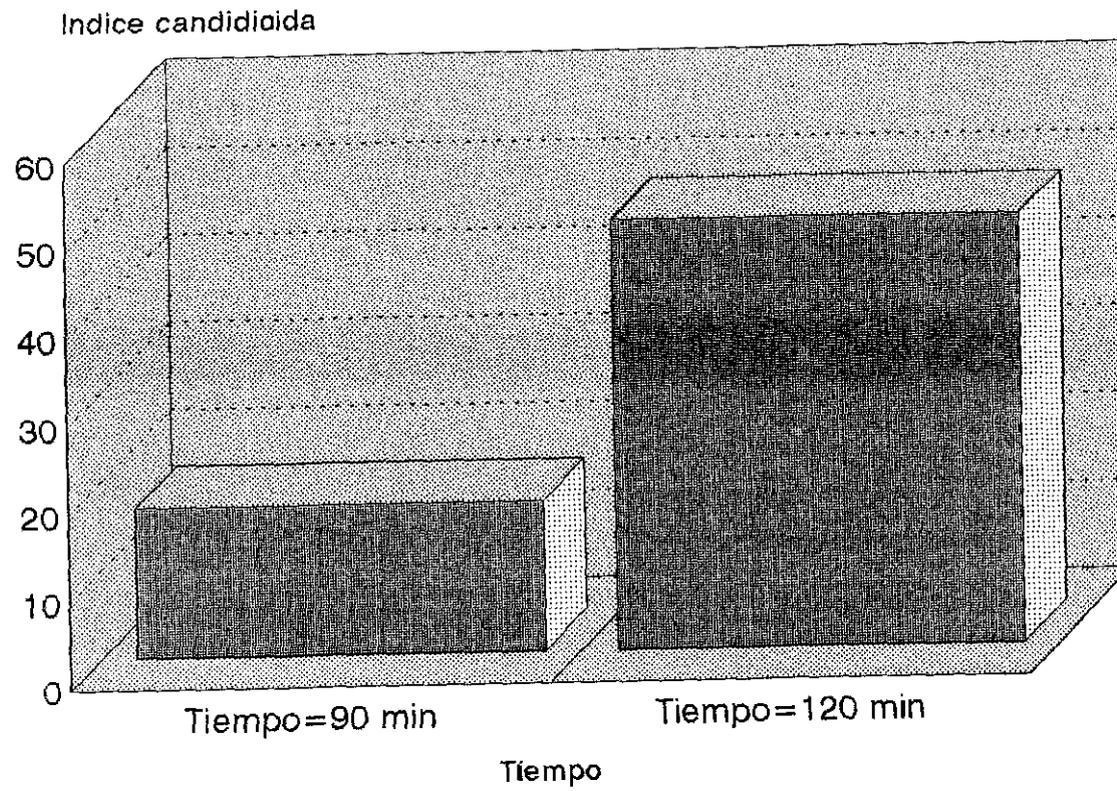


Figura 4. Indice candidioida de los macrófagos residentes peritoneales

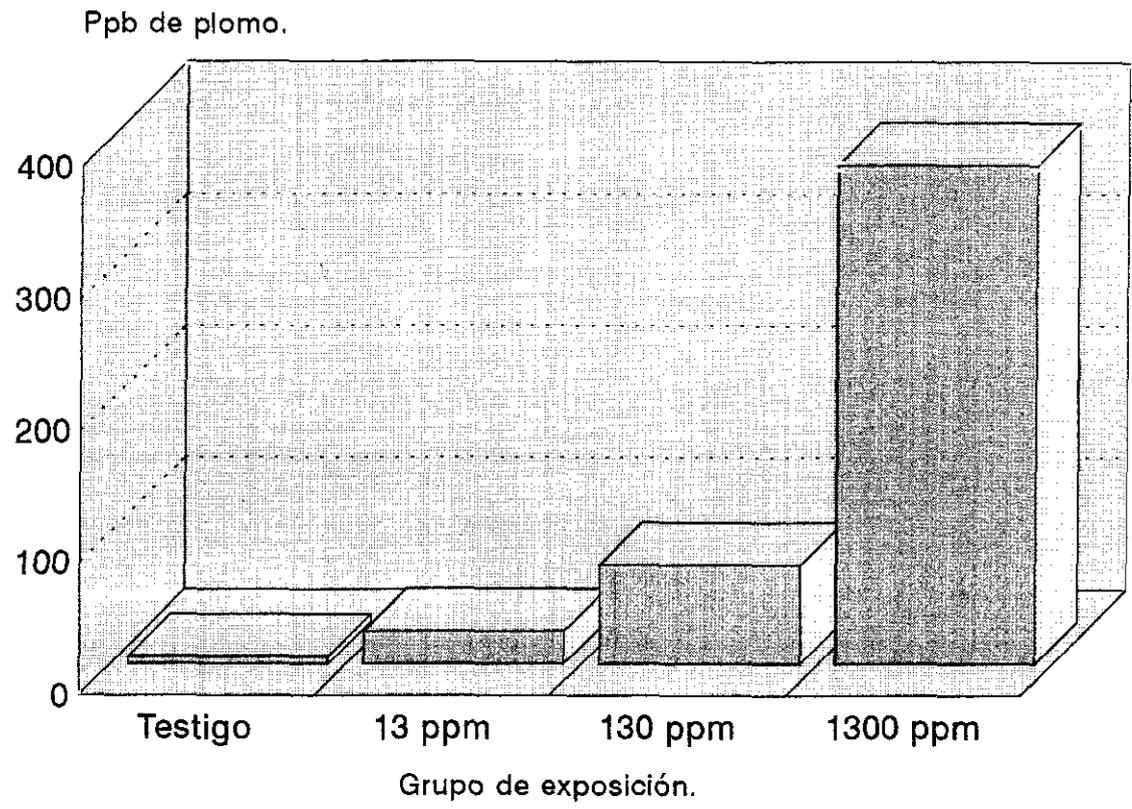


Figura 5. Ppb de plomo en riñón.

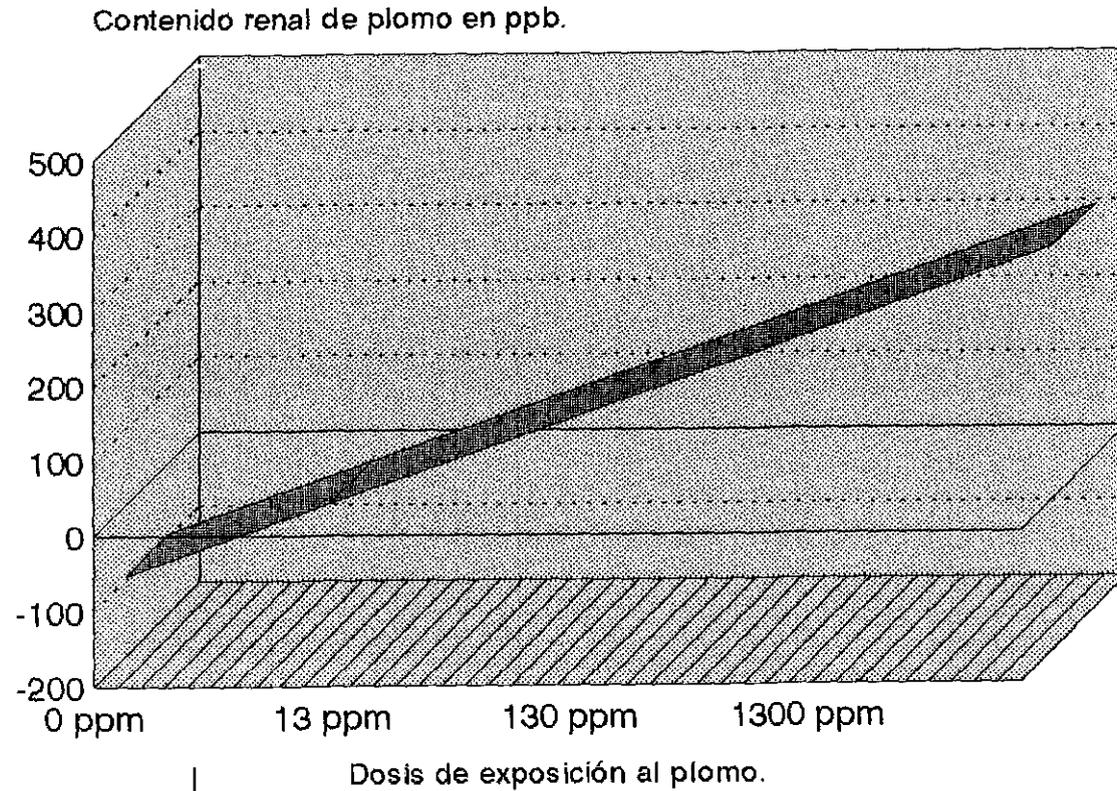


Figura 6. Regresión entre el contenido en plomo en ppb y la dosis de bebida.

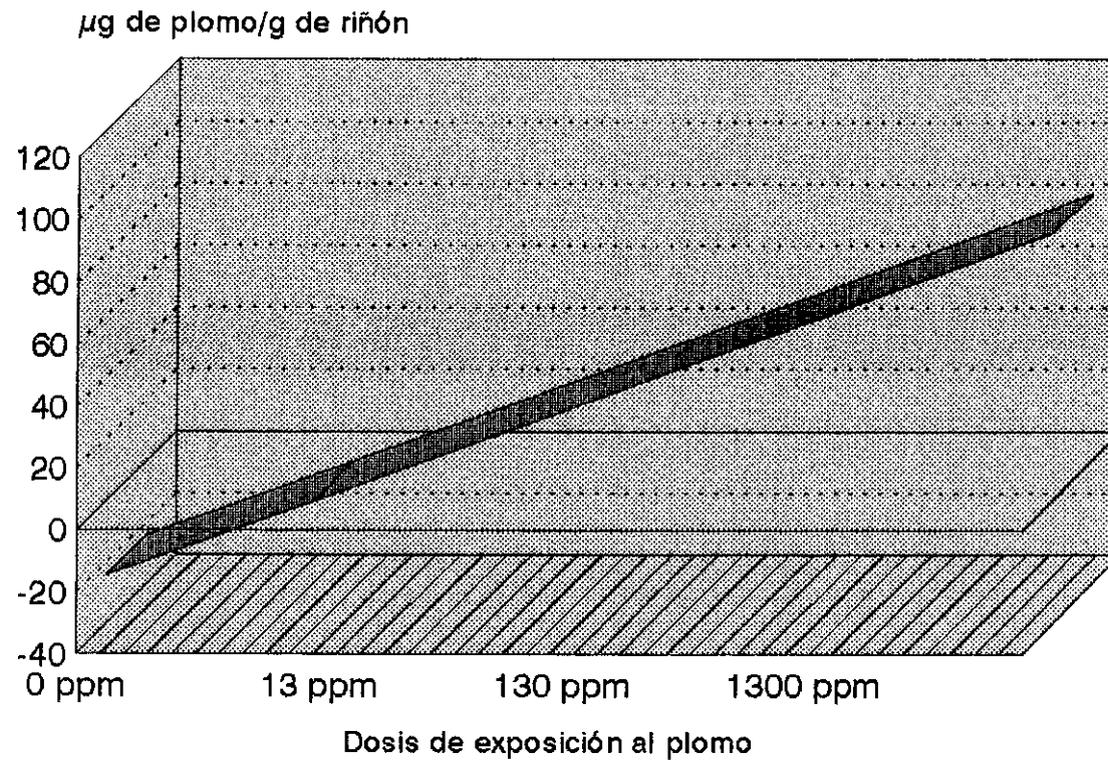


Figura 7. Relación entre la dosis de exposición al plomo y la concentración renal de metal corregida

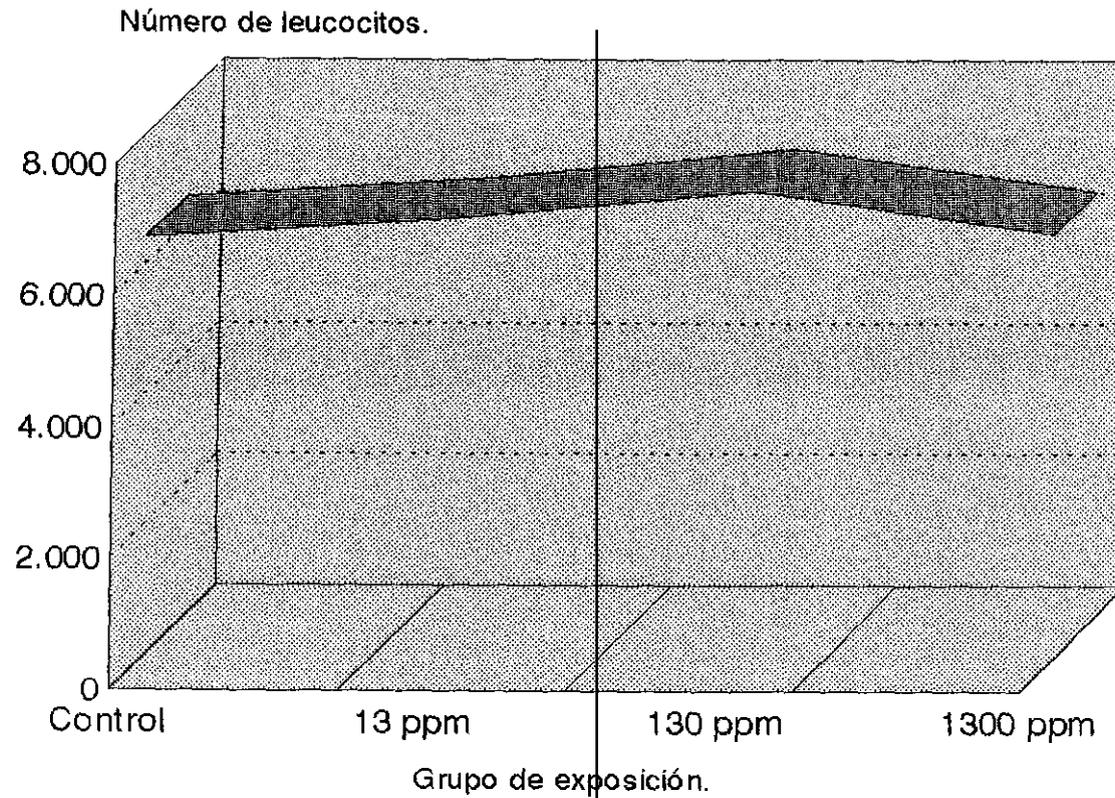


Figura 8. Número de leucocitos en los distintos grupos.

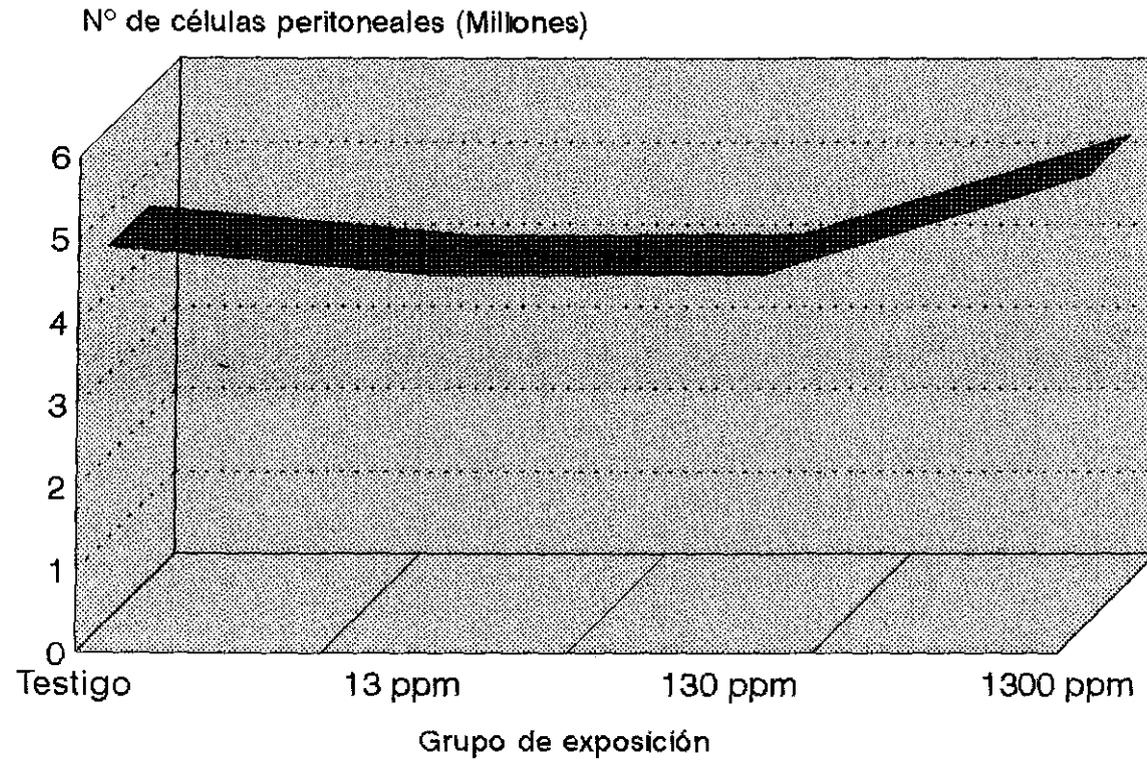


Figura 9. Número de células peritoneales en los distintos grupos de exposición al plomo.

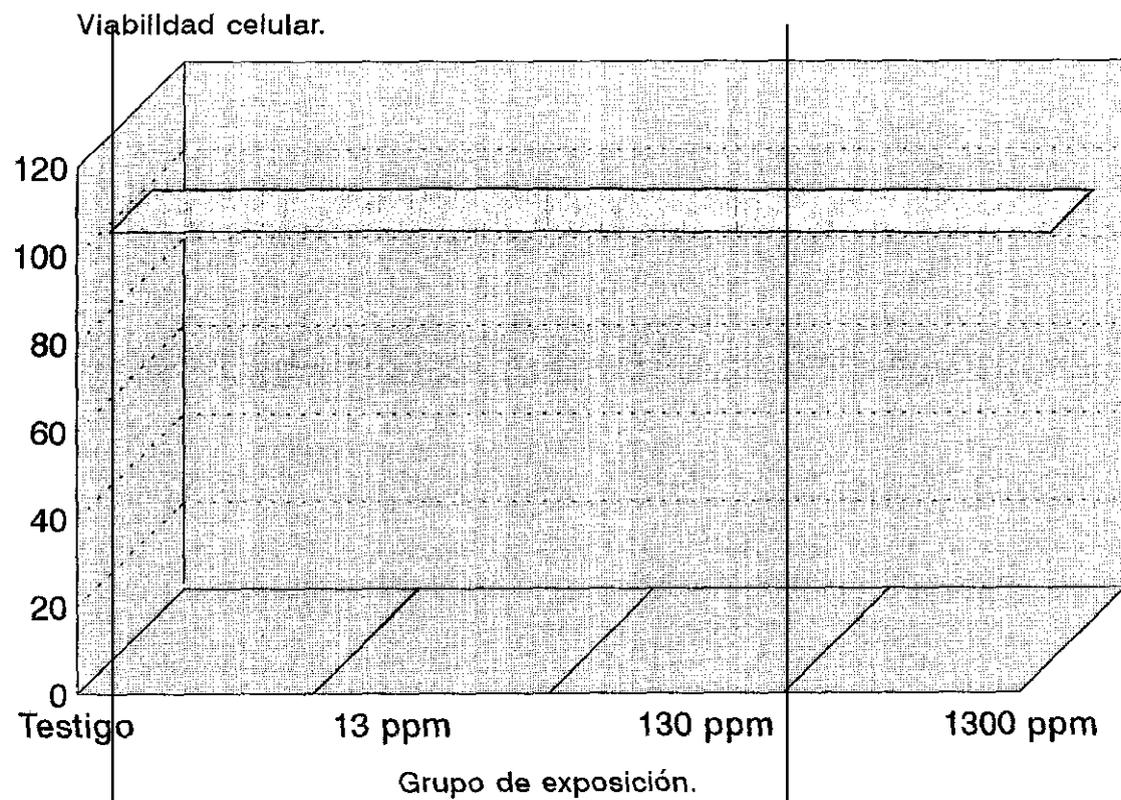


Figura 10. Viabilidad de las células peritoneales en la exposición al plomo.

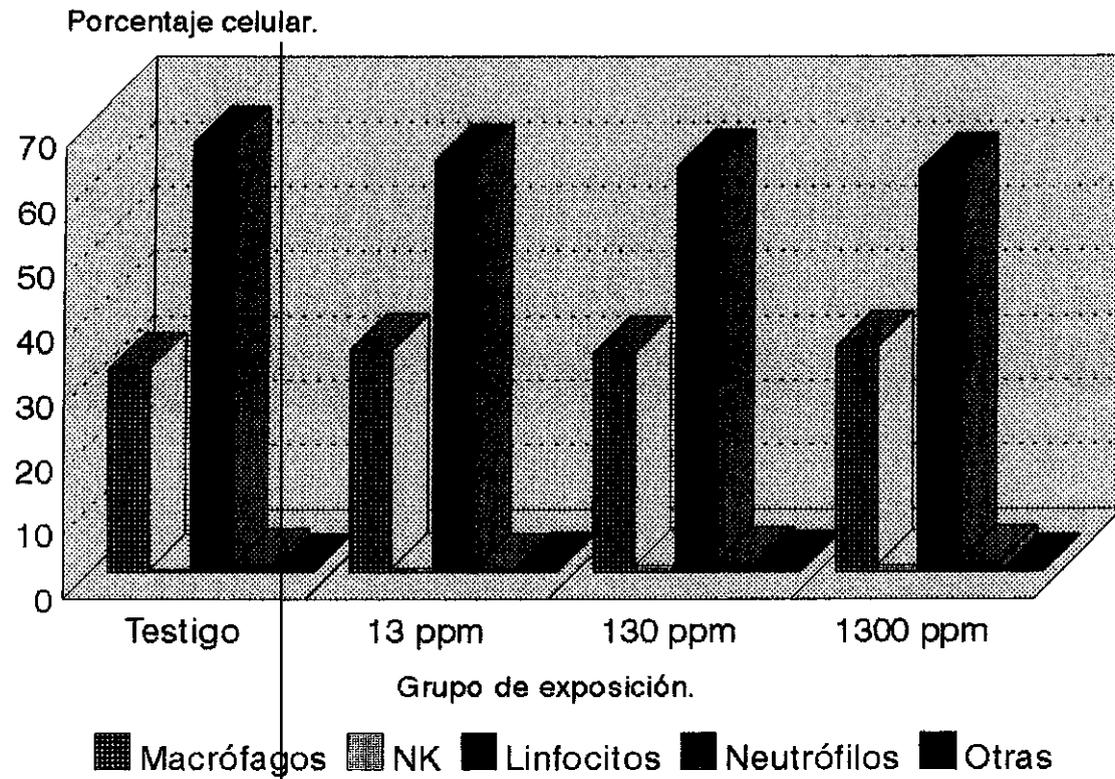


Figura 11. Composición celular peritoneal mediante la técnica de May-Grünwald-Giemsa.

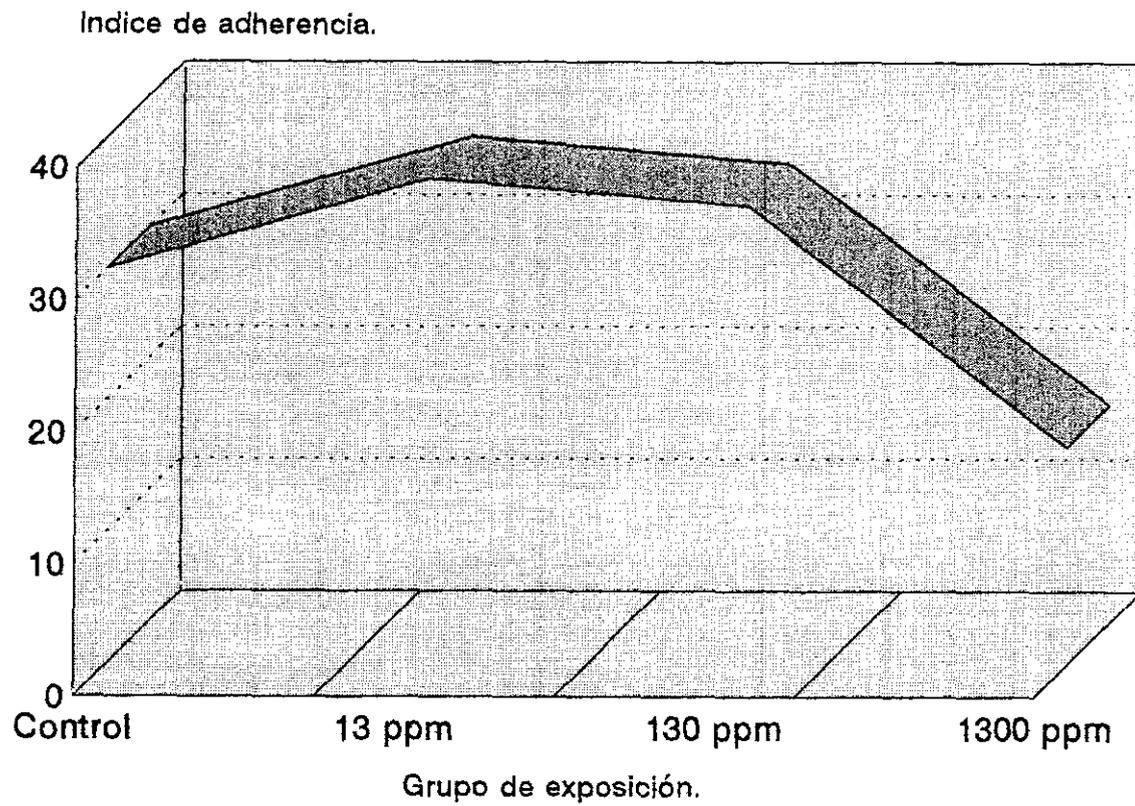


Figura 12. Indice de adherencia de las células peritoneales.

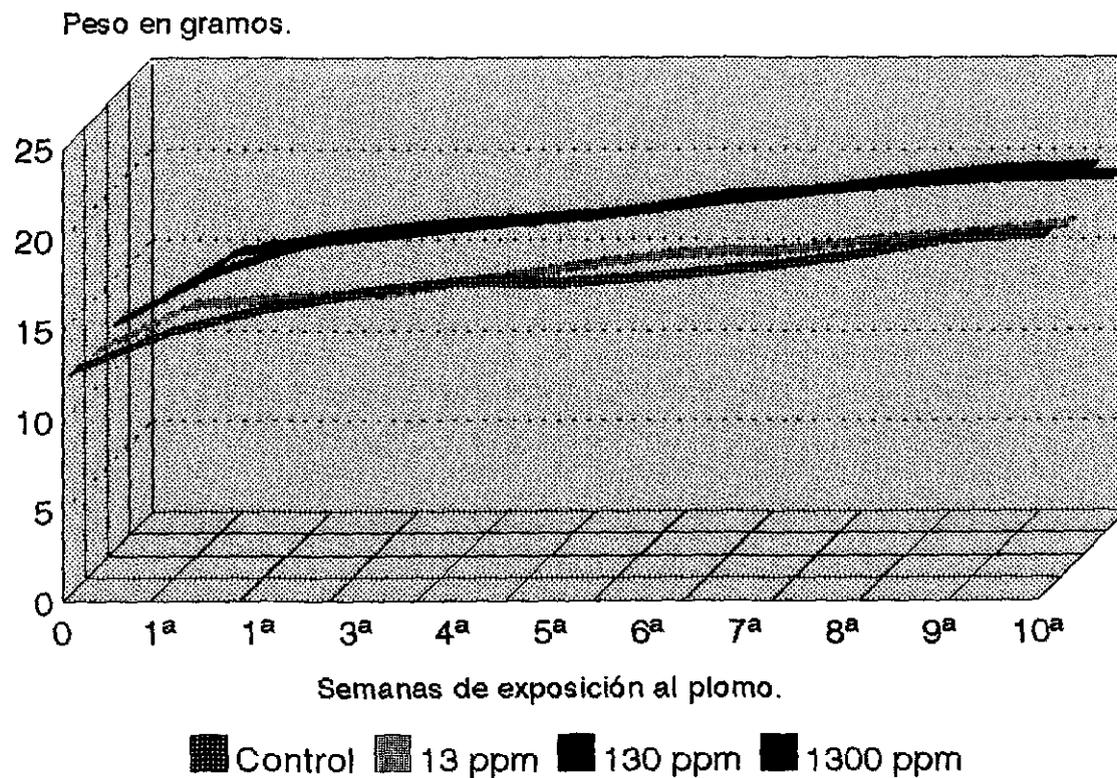


Figura 13. Desarrollo ponderal de los ratones expuestos durante 10 semanas al plomo. Segunda serie.

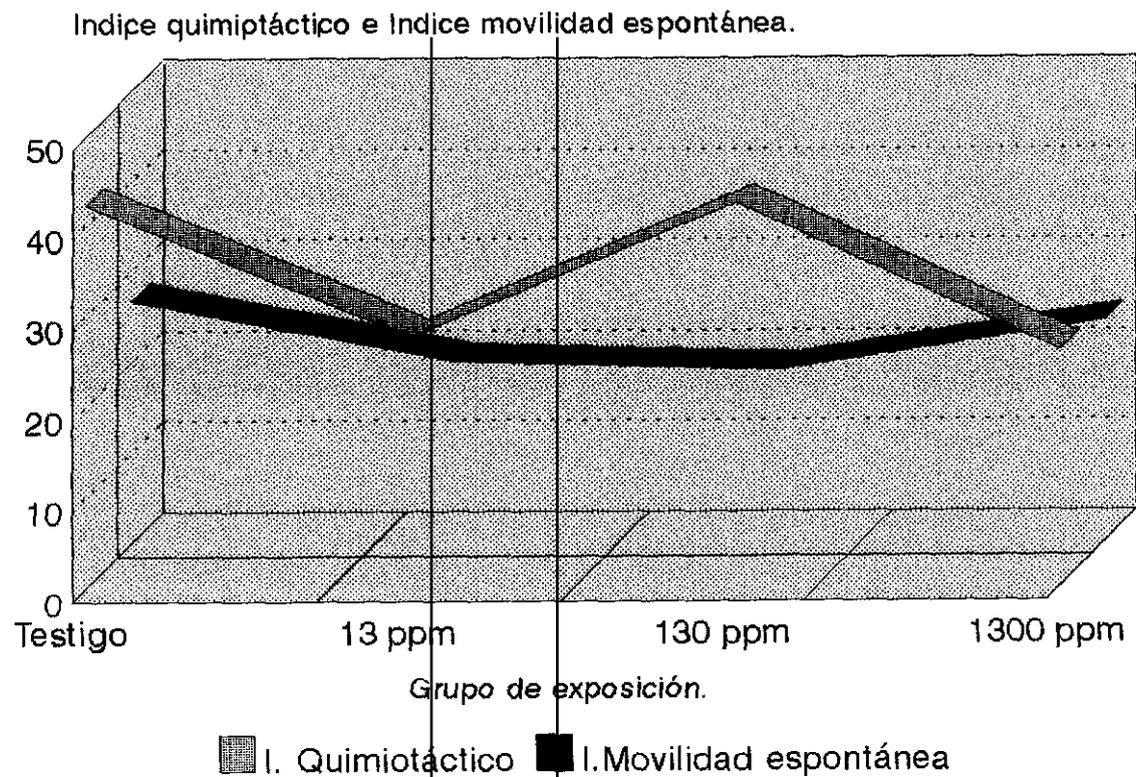


Figura 14. Índices quimiotáctico y movilidad espontánea de células peritoneales expuestas al plomo.

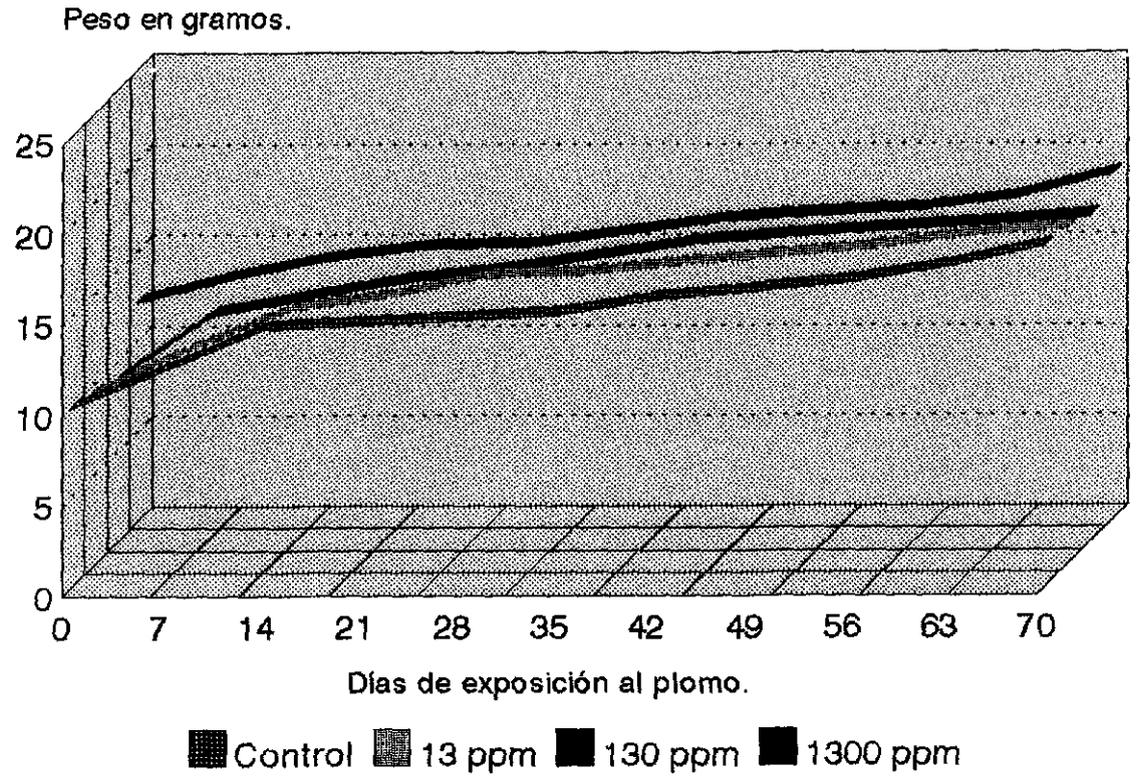


Figura 15. Desarrollo ponderal de los ratones expuestos 70 días al plomo.
Tercera serie.

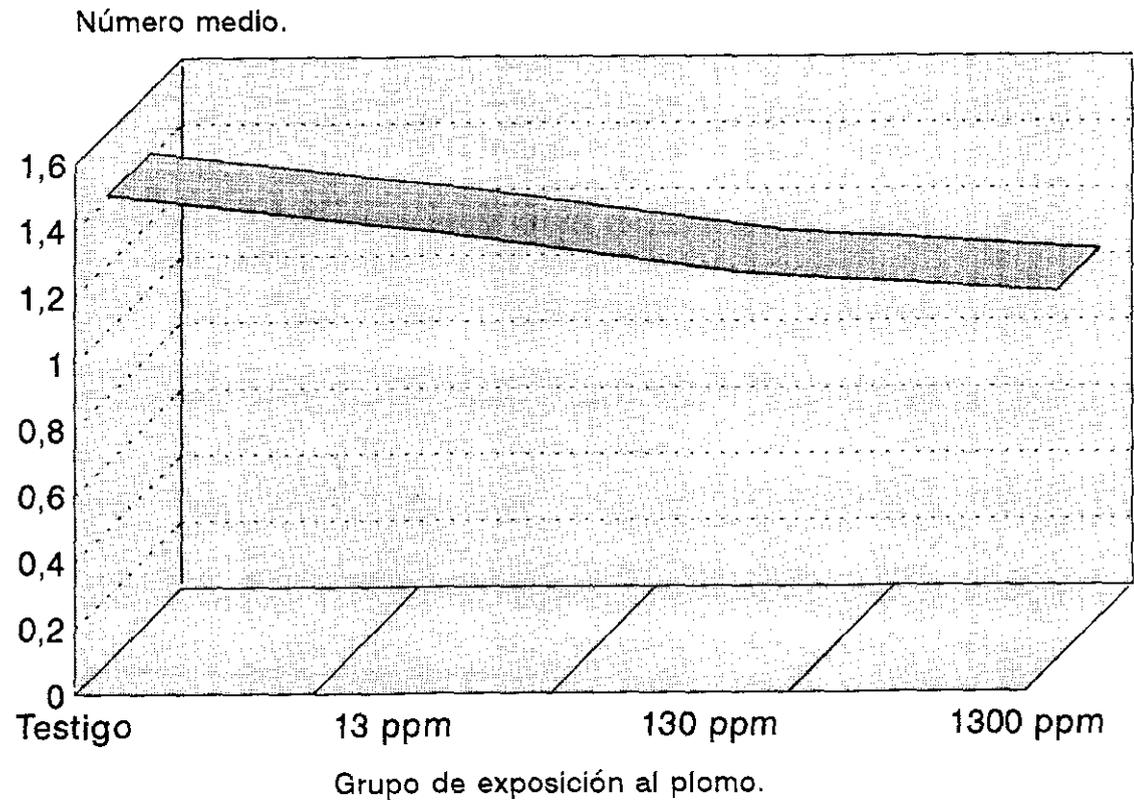


Figura 16. Número medio de *C.albicans* fagocitadas por macrófago.

V. *DISCUSSION*

1. VALORACION DEL MODELO DE INTOXICACION

1.1. VALIDEZ DE LA ADMINISTRACION DE ACETATO DE PLOMO, PER OS, A TRAVES DE LA BEBIDA, EN RATONES BALB/C.

El tracto gastrointestinal es la principal vía de entrada de plomo en el organismo en la población general, siendo ésta la vía reconocida para dos terceras partes del metal incorporado por esta población (66, 70). Escogimos, por esto, la exposición al metal por *vía oral*.

Seleccionamos el acetato de plomo por ser uno de los compuestos del metal más solubles en agua (443 g/l de agua fría) (220), y elegimos su exposición *per os*, a través de la bebida, como muchos otros investigadores (139, 141, 142, 144, 155, 158, 179, 222). Entre todos estos trabajos, elegimos el protocolo de Koller (142, 179), que es el más extendido en investigaciones de exposición subclínica al metal (139, 142, 165, 179, 230, 231).

Rechazamos la administración *vía gástrica*, que se ha empleado sobre todo en intoxicaciones únicas o de corta duración (143, 148), por el carácter crónico que deseábamos en nuestra exposición.

El mayor inconveniente que la elección de la *vía oral* podía tener, era la posibilidad de distinto consumo de líquido por los ratones, ya por rechazo de la bebida, al ser modificadas sus características organolépticas por la presencia del metal, ya por diferente necesidad en su consumo de acuerdo con las variaciones en temperatura. Si estos consumos fueran diferentes, las intoxicaciones en los diversos grupos podrían discrepar, alterándose el diseño experimental.

Realizamos un preensayo, para investigar estas posibilidades, en el que controlamos la cantidad de líquido bebida por animal, semanalmente, y diariamente vigilamos la

correcta homogeneización de la solución de acetato de plomo. El consumo medio era similar en todos los grupos de exposición, el control y los sometidos a 13, 130 y 1300 ppm, no existiendo rechazo del agua con plomo. Este hecho fue constatado previamente en otras cepas de ratones y con diferentes tiempos y dosis de exposición al metal (144, 158, 159), por lo que la vía de exposición *oral* nos pareció válida. También nuestros tres ensayos generales posteriores ratificaron estos resultados, que podríamos atribuir a un no rechazo del líquido, por sus características organolépticas, y a la realización de cada experimento general en la misma época del año, con sólo 2°C de diferencia en la temperatura del local.

Elegimos la cepa Balb/c de ratones porque en ella se ha demostrado, previamente, susceptibilidad a otros efectos inmunomodulatorios del metal (149, 177, 224).

1.2. VALORACION DEL BUEN ESTADO DE SALUD DE LOS ANIMALES

El crecimiento ponderal es un buen indicador del desarrollo de los animales y de su buen estado de salud. Además se ha observado una disminución en la ganancia de peso de humanos y animales expuestos al plomo (120, 225, 226), disminución que en animales es mayor que la de estatura (225). Por este motivo recogimos semanalmente el peso, durante los 70 días de la exposición.

El desarrollo ponderal mostró gran dispersión de resultados, que condujo a la existencia de no homogeneidad de varianzas entre grupos, por lo que tuvimos que analizar los resultados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se puede pensar en la existencia de factores individuales del desarrollo ponderal de cada ratón como causa de estas diferencias y no en el plomo, porque en ningún momento del seguimiento el peso varió significativamente entre los distintos grupos de exposición. Tampoco lo hicieron la ganancia de peso total, ni el peso final. Estos resultados coinciden con los de muchos otros investigadores (139, 148, 155, 158, 159, 160, 179) y se repitieron en los tres experimentos generales.

Mudzinski et al (149) en ratones, Koller et al (141) en cobayas y Grant et al (225) en ratas sí descubrieron un retraso ponderal en la exposición crónica al plomo. Los dos primeros investigadores, si bien utilizaron tiempos de intoxicación semejantes al nuestro, emplearon dosis 1,5 y 2 veces superiores a nuestra máxima exposición, que en el primer trabajo se tradujo en un menor consumo de líquido, hecho que podría explicar la disminución de peso (149).

Grant et al (225) en ratas expuestas crónicamente, desde la concepción, encontraron una disminución ponderal con dosis incluídas dentro de nuestro rango e incluso menores (50, 250 ppm). El retraso en el peso se manifestaba desde el nacimiento pero se hacía más importante durante la fase de ganancia ponderal rápida de las ratas (segundo y tercer mes). Estos últimos autores también pesaron las ratas durante la fase fetal (226), y obtuvieron resultados semejantes, por lo que se podría rechazar la hipótesis de que factores intrauterinos intervinieran en esta pérdida ponderal. Puede que alguna deficiencia inicial en los componentes de la leche materna o alteraciones metabólicas o endocrinas, producidas en las ratas y no en nuestros ratones, por su diferente edad al inicio de la exposición o por distinta receptividad de especie al plomo (161), explicarían las diferencias de nuestros resultados con los de Grant et al (225).

2. ESTANDARIZACION DE LAS TECNICAS

2.1. OBTENCION DE LAS CELULAS PERITONEALES

Mediante la inyección de sustancias en cavidad peritoneal se puede aumentar tanto el número como la proporción de macrófagos en las células peritoneales.

Sin embargo los macrófagos así obtenidos difieren de los residentes tanto en su origen, puesto que en un gran número acaban de emigrar de la circulación, como en sus propiedades morfológicas, bioquímicas y funcionales (228).

Al elegir diversos aspectos morfológicos y funcionales del macrófago como indicadores de la exposición subclínica al plomo, preferimos utilizar células peritoneales y macrófagos residentes, a pesar de su menor número, porque son los que se encuentran en situaciones de normalidad en peritoneo.

Encontramos en la revisión bibliográfica del tema, el empleo de diferentes volúmenes de medio para la obtención de células peritoneales (204, 208, 206, 212).

La inyección peritoneal de 10 ml nos producía una gran distensión de la pared abdominal y pérdida de volumen, debido probablemente al escaso peso final medio de nuestros ratones (20 g). Por este motivo disminuimos este volumen y empleamos 2 y 4 ml.

Con el volumen de 4 ml conseguíamos un 155% de células del volumen de 2 ml, siendo las diferencias estadísticamente significativas (prueba U de Mann-Whitney, $p < 0,001$).

Este número celular estaba en el rango superior de células residentes peritoneales obtenidas en ratones según otros autores (204, 228), por lo que elegimos el uso de 4 ml de volumen para esta inyección. La menor obtención celular con el volumen de 2 ml probablemente se debió a que un volumen escaso conducía a una distensión peritoneal insuficiente, con pérdida en la cavidad de parte de las células.

2.2. ADHERENCIA COMO METODO DE SEPARACION

Nos propusimos el aislamiento del macrófago del resto de los componentes celulares residentes de peritoneo. Existen diversas técnicas de separación de los macrófagos de otras células, pero en la actualidad ninguno de estos métodos es totalmente satisfactorio, en parte por la gran heterogeneidad de la línea monocito-macrofágo. Una de las técnicas más extendidas con este fin es la adherencia a superficies de plástico (208, 209, 212), basada en la propiedad de los macrófagos de unirse a sustratos sólidos y este fue el método de aislamiento que empleamos.

En primer lugar procedimos a la utilización de 2 concentraciones celulares diferentes de partida y al uso de un "shock térmico" para su posterior separación del plástico. Nuestra mejor obtención de células despegadas, fue de un 12,3 % de la población inicial, con la concentración celular de partida más baja, pero también hubo con ella una mayor dispersión de los resultados. En otros experimentos usamos la tripsina con este fin, no existiendo tampoco significación estadística con las pruebas anteriores, en las que empleamos el choque térmico. Hubo gran diferencia entre las varianzas, según el método, hecho que nos condujo a un análisis no paramétrico, la prueba de Kruskal-Wallis. Por otra parte los resultados eran equivalentes a los obtenidos por otros investigadores (203).

La viabilidad celular fue semejante con los 3 métodos, siendo globalmente del 82%, viabilidad similar a la referida por otros autores (209).

Si realizáramos una corrección para esta viabilidad celular, la población recuperada de células útiles era un 10 % de la de partida, representando aproximadamente 400.000 células adherentes por ratón. Estas células peritoneales adherentes contienen también linfocitos T y B, fibroblastos y neutrófilos, en un 5 a un 10% (208, 209) por lo que obtendríamos aproximadamente 370.000 macrófagos por animal, número de células insuficiente para el desarrollo de la mayor parte de las técnicas siguientes.

También la metodología usada para esta separación celular, podía afectar la función de los macrófagos (209) y nuestras futuras investigaciones, hecho que junto al bajo número de células recuperadas del plástico, nos hizo abandonar esta técnica de enriquecimiento de células de la línea monocito-macrofágica.

2.3. ESTUDIO DE LA COMPOSICION CELULAR

El plomo podía modificar la composición celular peritoneal. Además necesitábamos conocer la fórmula de la serie blanca de peritoneo para determinar la cantidad de macrófagos, que obteníamos a partir del número total de células y de la proporción en ellas de la línea monocito-macrofágica.

La cavidad peritoneal tiene una población residente formada por linfocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos y otros elementos celulares. El número y la proporción de estas células en peritoneo varían con la cepa, sexo y edad.

En las hembras se ha encontrado un mayor número de macrófagos (204), por lo que elegimos este sexo.

La edad de 8 a 12 semanas parece ser la más adecuada para obtener una mayor cantidad celular (204), edad que utilizamos para la estandarización de nuestras técnicas. Sin embargo, por el diseño del protocolo de exposición al plomo, empleamos posteriormente para la investigación de los efectos de este metal sobre las células de la línea monocito-macrofágica, hembras de 14 semanas.

Deseábamos estudiar los diferentes efectos del plomo, con los medios presentes en un laboratorio clínico básico y de forma económica. Rechazamos por este motivo el uso de anticuerpos monoclonales para la diferenciación celular y seleccionamos un método tintorial. Empleamos una adaptación de la tinción de May-Grünwald-Giemsa y procedimos a su estandarización, obteniendo una proporción macrofágica del 32,1 %, porcentaje corroborado previamente en ratones, por otros autores (206).

2.4. ADHERENCIA

La adherencia es el conjunto de fuerzas que unen la célula con otras superficies (229), necesitándose para la locomoción y la fagocitosis. Es una función fundamental para las acciones, afectoras y efectoras, de los macrófagos, por lo que hemos realizado la estandarización de la técnica de adherencia, según modificaciones de De la Fuente (212).

El **Índice de adherencia** de nuestra población peritoneal era de 32,8, y el de los macrófagos de 93,9, semejante al obtenido por De la Fuente (212) en la misma cepa de ratones.

Nuestro método de recuperación de las células no adheridas, necesario para hallar el índice, era ligeramente diferente y más enérgico (209) que el utilizado por esta investigadora (3 lavados con medio frío frente a 3 aspiraciones con una micropipeta), por lo que el índice podía haber sido menor. Sin embargo, el hecho de realizar nosotros la adherencia durante 1 hora más, probablemente sea la causa de que ésta fuera más intensa y el resultado final semejante.

2.5. ESTANDARIZACION DE LA QUIMIOTAXIS Y LA MOVILIDAD ESPONTANEA

La capacidad de movimiento es una de las características fundamentales de los macrófagos. Esta movilidad puede estar dirigida hacia un gradiente quimiotáctico de concentración, llamándose quimiotaxis, o ser debida al azar, denominándose movilidad espontánea (230). Dentro de esta última debe distinguirse entre la movilidad espontánea estimulada o quimioquinesis, producida por la interacción entre la célula y una sustancia quimiotáctica sin gradiente de concentración (231) y la movilidad espontánea no estimulada, ocasionada por el movimiento celular aleatorio.

Existen dos métodos cuantitativos que miden la quimiotaxis y la movilidad espontánea *in vitro*: el método del filtro del microporo y el de la agarosa.

El primero fue introducido por Boyden en 1962 (213) y consiste en una cámara con un compartimento superior, dónde se incuban las células y uno inferior, que contiene la sustancia quimiotáctica. En medio se introduce un filtro con microporos de un tamaño suficiente para permitir el paso activo de las células, pero no su caída. Después de un tiempo apropiado los filtros se fijan y se evalúa la locomoción celular (215).

En el método de la agarosa las células se colocan en un pocillo central, cortado en un gel de agarosa y emigran hacia los 2 pocillos exteriores, dónde se introduce en uno la sustancia control y en otro la quimiotáctica.

Hemos elegido el método del filtro con microporo, en primer lugar, por la simplicidad de la técnica y del manejo de las cámaras necesarias para su realización, que lo han hecho especialmente útil en los laboratorios clínicos (232). Además la emigración a través de los microporos imita mejor el movimiento de los leucocitos en los tejidos. La reproducibilidad experimental de este método es, por otro lado, de 50 a 100 veces mayor que la del método de la agarosa (231). Finalmente, la técnica del microporo puede modificarse para el uso con poblaciones celulares mixtas, como es la nuestra (231).

Existen en el mercado dos tipos de filtros para la realización de la quimiotaxis por el método del microporo: los filtros de policarbonato y los de nitrocelulosa. Hemos elegido los primeros porque permiten la evaluación morfológica del tipo celular emigrado (232) y requieren menor tiempo de incubación.

Escogimos la caseína entre las sustancias quimiotácticas porque es un control positivo barato y muy estable (232). Su concentración óptima, para la realización de la quimiotaxis, se ha descrito en un rango de 0,5 a 5 mg/ml (214). Utilizamos 3 y 5 mg/ml de caseína durante la estandarización de la técnica del microporo (215).

Realizamos la quimiotaxis y la movilidad espontánea durante un tiempo de 4 horas porque los macrófagos requieren más tiempo para el movimiento que los granulocitos y los monocitos de ratón, siendo necesario un mínimo de 3 horas (236).

La quimiotaxis con 3 mg/ml fue casi el doble que con 5 mg/ml (t Student, $p=0,0009$). Con la concentración de 3 mg/ml pasaban de 10,36 a 29,61 células más que con la de 5 mg/ml. Este resultado se ve apoyado por el descubrimiento previo de que los fagocitos de ratón y cobaya disminuyen su actividad quimiotáctica cuando ciertas concentraciones del estímulo son superadas (233). El incremento del agente quimiotáctico podría bloquear la interacción con los receptores ya ocupados (233), o desactivar los mismos en un proceso de "baja regulación" (234). El quimioatrayente a altas concentraciones también podría aumentar la adherencia de la célula, disminuyendo por este

mecanismo su movilidad (229, 236), o estimular simultáneamente muchos receptores e incapacitar la polarización celular efectiva necesaria para el movimiento (236).

Nuestro **Índice quimiotáctico** no fue muy alto, pero hay que considerar un factor que puede contribuir a ello: el tipo de célula empleado, el macrófago residente.

Sólo un 20% de los macrófagos residentes pueden ser estimulados a la locomoción frente a los macrófagos obtenidos con diversas sustancias estimuladoras, que lo hacen en un 70% (230).

Quisimos confirmar que la caseína era un estímulo quimiotáctico adecuado para la población celular utilizada, la residente. Para ello realizamos una comparación interna, dentro de nuestro experimento de estandarización, entre la quimiotaxis y la movilidad espontánea, mediante la prueba t de Student bilateral. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,0017$), por lo que finalmente escogimos esta sustancia para la realización de la quimiotaxis.

2.6. ESTANDARIZACION DE LA OPSONIZACION Y FAGOCITOSIS DE CANDIDA Y DEL PODER CANDIDICIDA DE LOS MACROFAGOS

La fagocitosis es una de las principales acciones defensivas de los macrófagos, como ocurre con los neutrófilos y monocitos. El contacto entre el patógeno y las células citadas, mediado por las opsoninas del suero, facilita la fagocitosis.

El proceso fagocítico puede cuantificarse por diferentes métodos, unos mediante la cinética de desaparición del microorganismo del medio y otros por el porcentaje de fagocitos con microorganismos o por el número medio de éstos que existen en su interior.

La medida de la acumulación de las partículas en el interior de las células es más fiable que la cuantificación de su disminución en el medio extracelular (237). En este último caso los métodos son más laboriosos y además se necesitan largos periodos de incubación, por lo que pequeñas alteraciones pueden no ser detectadas (204).

Elegimos la medida de la fagocitosis mediante el **Índice fagocítico**, que es el porcentaje de células que han fagocitado *Candida albicans*, y el **Número medio de *C. albicans* por macrófago**. Seleccionamos este microorganismo por su fácil cultivo (210) y buena visualización por microscopía óptica.

Este tipo de ensayos puede realizarse mediante el uso de las suspensiones celulares, las opsoninas y las *C. albicans* en tubos de centrifuga o en pocillos. La utilización de pocillos tiene la ventaja de que selecciona poblaciones adherentes, pero la rechazamos porque debido a un fenómeno físico de tensión superficial la mayor parte de las células era desplazada hacia los bordes del pocillo, donde la lectura microscópica era poco fiable.

Cuando los fagocitos, los microorganismos y la fuente opsonica se introducen en el ensayo simultáneamente, la fagocitosis es en realidad la combinación de la medida de la ingestión con la de la opsonización (237), por lo que se debe preincubar las partículas con la opsonina por separado. Por este motivo realizamos la opsonización en una fase previa a la ingestión, durante 30 minutos y utilizando un 10% de suero fetal de ternera descomplementado (mediante el calentamiento a 56°C durante 30 minutos).

Elegimos para la estandarización de la técnica de fagocitosis tiempos de 90 y 120 minutos porque estudios realizados previamente demostraron que la actividad fagocítica de los macrófagos es más lenta y menor que la de los granulocitos (216). También por ello utilizamos una proporción 2:1 *C. albicans* por macrófago. No prolongamos el tiempo de fagocitosis porque a partir de las 3 horas comienza el crecimiento micelial, que interfiere con los recuentos (217).

En nuestros experimentos tanto el **Índice fagocítico** como el **Índice candidicida** fueron superiores a los 120 minutos ($p=0,016$ y $p=0,0052$, respectivamente). El **Número medio de *C. albicans* por macrófago** y el **Número de macrófagos con *C. albicans* adheridas** fueron semejantes con los dos tiempos ($p=0,11$ y $p=0,42$ recíprocamente), hecho previamente confirmado por otros investigadores con otros microorganismos (204).

3. EXPOSICION AL PLOMO Y RIÑON

El riñón es un órgano que concentra plomo y realiza un papel fundamental en su metabolismo y eliminación. En el modelo de distribución tricompartmental del metal, desarrollado por Rabinowitz et al, el riñón forma parte del compartimento de los tejidos blandos (70, 81), siendo los otros dos la sangre y los tejidos duros. Como la velocidad de intercambio del plomo desde los tejidos blandos es más lenta que la sanguínea, la vida media del plomo en los tejidos es ligeramente superior que en la sangre (70, 81).

También el riñón es uno de los principales órganos diana en la toxicidad bioquímica e histológica del plomo (105, 227), motivo por el que lo seleccionamos como el principal indicador de referencia de la exposición a varias concentraciones de plomo (13, 130 y 1300 ppm), durante un tiempo de 10 semanas.

Se ha descubierto, como signo precoz de la exposición plúmbica, un aumento relativo del peso del riñón (227, 238). Este incremento se produce a niveles de exposición tan bajos como las 5 ppm (227). En nuestro experimento, realizado con ratones hembras Balb/c, no se encontró este signo a pesar del empleo de concentraciones del metal más elevadas. El peso del riñón y su proporción respecto al peso corporal fueron semejantes en los 4 grupos (control, 13 ppm, 130 ppm y 1300 ppm).

Los anteriores investigadores (227, 238) iniciaron la exposición prenatalmente o en el momento del nacimiento, edades que podrían hacer a los animales más vulnerables a los efectos renales del metal.

Otro factor, que podría explicar las diferencias en esta receptividad al plomo, es la diferencia de susceptibilidad de especie, ya que Sobottka et al (238) y Fowler et al (227) emplearon en su estudio ratas y nosotros ratones.

Tampoco debería olvidarse la influencia que parece tener el sexo en los cambios estructurales y bioquímicos renales, descubrimiento hecho por Fowler et al (227). Estos

investigadores encontraron una mayor vulnerabilidad en el umbral de aparición de este signo en los animales machos, mientras que la afectación ante altas dosis de exposición era mayor en hembras. Nuestro estudio fue realizado con hembras y quizás no alcanzamos el umbral de exposición preciso para que apareciera este signo.

Como muchos otros investigadores, hemos medido la concentración renal de plomo, (139, 143, 148, 227, 238). Previamente, se ha descubierto un aumento paralelo de la concentración renal de plomo respecto a la concentración sanguínea en intoxicaciones agudas (239) y crónicas (82, 227). El incremento de la concentración renal de plomo se relacionaba además con la dosis de exposición (139, 144, 239). En nuestra cepa de ratones no se había investigado, en la bibliografía revisada, las concentraciones renales del metal, tras una exposición crónica con varias dosis del metal (0, 13, 130 y 1300 ppm).

Las diferencias en los valores de plomo en riñón, según las dosis, eran muy significativas (Kruskall-Wallis $p=0,0000000563$) y las concentraciones renales se relacionaban altamente con la dosis de exposición al metal, lo que explicaba el 98% del contenido en metal. Por otro lado sólo los riñones del grupo expuesto a 1300 ppm de plomo superaban los 25 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, considerados como el umbral diagnóstico de intoxicación plúmbica en mamíferos (240).

Es difícil comparar directamente nuestros resultados medidos en μg de plomo/g de peso seco renal con los de otros autores que lo hacen con el peso húmedo, pero la razón de las concentraciones renales para cada dosis de exposición respecto a las del control es muy semejante a las obtenidas por otros investigadores, con las mismos niveles del metal (139, 179).

Nuestros resultados en la medida de la concentración renal de plomo, tras 10 semanas de exposición a 13, 130 y 1300 ppm, la confirman como buen indicador de la dosis de plomo suministrada ($r=0,989$ entre la cantidad administrada y su concentración en riñón).

4. EXPOSICION AL PLOMO Y RECUESTO DE HEMATIES

Los disturbios hematológicos, asociados con la exposición plúmbica, han sido parte importante del cuadro clínico de esta enfermedad y por lo tanto muy investigados. Los dos componentes de la vida media del hematíe están afectados por el metal, existiendo una disminución de su producción, tras un inicial aumento de las formas jóvenes, y una destrucción acelerada (78, 87).

Hemos estudiado el número de hematíes/ μ l de sangre, de ratones Balb/c, tras 10 semanas de exposición al plomo (13, 130 y 1300 ppm de plomo). La dispersión de los resultados nos obligó a realizar su análisis mediante una prueba no paramétrica (Kruskall-Wallis $p=0,45$), que nos demostró que no había diferencia significativa entre los grupos.

Nuestros resultados son semejantes a los obtenidos, en exposiciones crónicas al metal, por otros investigadores en ratones y en ratas (163, 238). Sin embargo no coinciden con los obtenidos por otros estudios, si bien éstos son tras exposiciones agudas (175) o de menor duración (238).

La falta de cambios en el número de hematíes/ μ l nos sugiere que este parámetro no es un buen indicador, en ratones, de la exposición crónica plúmbica. La disminución de hematíes es además un signo de clara toxicidad del metal y en este estudio sólo la dosis más elevada (1300 ppm) puede considerarse tóxica (240).

5. EXPOSICION AL PLOMO Y SERIE BLANCA

Se han descubierto alteraciones en el número y proporción celular de la serie blanca de otras cepas y especies animales expuestas al plomo (166, 167, 240), hecho que motivó la investigación de este parámetro en nuestra cepa Balb/c de ratones.

En nuestros experimentos el número de leucocitos era semejante en todos los grupos. Tampoco se diferenciaban los recuentos diferenciales.

El número de linfocitos/ μ l, fue semejante en los 4 grupos (ANOVA $p=0,67$). No coincidió este hallazgo con el aumento de linfocitos encontrado por Santos et al (167) tras exposiciones más agudas. Esta linfocitosis observada en anguila, expuesta durante 30 días al plomo, sugiere una respuesta inmunológica, que resultaría de la estimulación directa de esta serie por el plomo, o de la existencia en estos animales de una infección latente bacteriana o viral (167). Apoyando la primera teoría está el descubrimiento de la acción mitógena del metal, que se ha demostrado *in vitro* (159, 242). El aumento de la susceptibilidad a las bacterias y virus por el plomo ha sido ampliamente ratificado (131-140), por lo que las anguilas podían tener una infección subclínica. La diferente vulnerabilidad de especie y la mayor duración de nuestra exposición podrían explicar esta diferencia de resultados (161).

Analizamos el número de granulocitos en sangre, según el grupo de exposición. Dentro de cada grupo había gran dispersión de resultados, pero ésta entre grupos era semejante, por lo que cumplía la homogeneidad de varianzas y se pudo utilizar la prueba ANOVA. No había significación estadística y las pequeñas diferencias en el número de neutrófilos se deberían por lo tanto a factores intrínsecos de los animales y no a la exposición al metal.

Estos resultados no coinciden con la neutrofilia descubierta por Hogan (166), pero son semejantes a los encontrados por Schlick et al (241), quienes hallaron neutrofilia tras exposiciones únicas o de 10 días de duración, neutrofilia que no se manifestaba con exposiciones más crónicas.

La granulocitosis descubierta por Hogan (166) parecía deberse fundamentalmente a una movilización de los neutrófilos de sus lugares de reserva. La neutrofilia alcanzaba su máximo tras 4 días de exposición, se mantenía hasta el octavo día y luego iba disminuyendo. Nuestra medida fue realizada después de 70 días, por lo que esta movilización podría haberse agotado, como ya lo indicaron Schlick et al (241) después de

30 días. Hogan (166) proponía que el plomo podría acumularse hasta un umbral, a partir del cual se liberarían sustancias que atraerían a los neutrófilos. Nos parece poco probable que la neutrofilia represente una respuesta quimiotáctica "per se" porque un gradiente quimiotáctico sólo se puede mantener durante un breve periodo de tiempo (243) y además produce una acumulación de neutrófilos en pocas horas (244).

Se ha propuesto que la disminución de la adherencia de las moléculas LAM-1 endoteliales y β_2 integrinas celulares, causaría la "demarginación" de los neutrófilos maduros de los sinusoides venosos medulares y su liberación de la médula ósea (243).

El plomo o el quimioatrayente, inducido por este metal, propuesto por Hogan (166), podrían modificar la adherencia de estas proteínas superficiales celulares (176).

Finalmente esta sustancia, tal vez un CSF (Factor estimulador de colonias), quizás intervendría también en la producción de neutrófilos, explicando el 16% de la granulocitosis de nueva creación que encontró Hogan (166).

La desensibilización en la quimiotaxis, que se produce ante la estimulación repetida de los leucocitos por los quimioatrayentes (245), podría darse también en esta acción de las sustancias quimiotácticas sobre la adherencia, explicando así la desaparición de la leucocitosis con el tiempo.

6. PLOMO, NUMERO Y RECUENTO DE CELULAS PERITONEALES

Desde que Selye et al (131) descubrieron el aumento a la susceptibilidad a las endotoxinas provocada por el plomo, muchos otros investigadores han ratificado este hecho (132-137). La investigación de la función fagocítica del sistema retículoendotelial en la exposición al plomo, ha conducido a resultados muy diversos (132, 133, 136).

La presentación antigénica por los esplenocitos y macrófagos peritoneales está disminuída, tras el contacto con este metal, (181, 224) y aumentada por las células de

Langerhans (184).

La acción de ciertas citoquinas, el MAF (Factor activador de los macrófagos) (183) y el MIF (Factor inhibidor de la emigración) (178), sobre el macrófago también están disminuídas por el plomo. Finalmente hay un descenso en las acciones inmunitarias humorales y celulares que requieren la cooperación del macrófago (144, 161).

Como todas estas acciones en las que interviene el macrófago están modificadas nos propusimos investigar los efectos del metal sobre el número, la viabilidad y la proporción de los macrófagos, así como sobre ciertas propiedades de esta célula, como la adherencia, el movimiento y la fagocitosis de *C. albicans*.

Nuestro estudio no demostró diferencias significativas ni en el número, ni en la proporción de macrófagos, tras la exposición *in vivo* durante 70 días al metal, análisis que realizamos mediante la prueba ANOVA. Según la bibliografía revisada somos los primeros que medimos los efectos del plomo tanto sobre el número como sobre la composición de las células peritoneales, por lo que no pudimos comparar nuestros resultados con los de otros investigadores, de forma directa.

La principal fuente de los macrófagos de los tejidos y las cavidades corporales es la médula ósea (246). En condiciones normales de equilibrio, los precursores de los macrófagos maduran en ella hasta monocitos, en un proceso en el que intervienen las citoquinas CSF-1 (Factor estimulador de colonias-1), GM-CSF (Factor estimulador de colonias granulocíticas-monocíticas) e IL-3 (Interleuquina 3) (246).

Luego, los monocitos son liberados a la corriente sanguínea y emigran hasta la cavidad peritoneal y los tejidos, donde se diferencian a macrófagos.

La médula ósea es origen de un 61 % de la población peritoneal de macrófagos en ratón. El resto de la población macrofágica proviene de la división celular local, en la que parece intervenir la citoquina GM-CSF (247).

Kowolenko et al (176) estudiaron, en ratones, los efectos de la exposición *in vitro* al metal sobre un cultivo de células de la médula ósea con CSF-1. El plomo disminuyó la recuperación celular total, aumentando la de células no adherentes y reduciendo la de adherentes (macrófagos). Además, ningún estadio celular de la línea monocito-macrofágica estaba libre de los efectos inhibidores del metal.

Miszta (175) expuso *in vivo* al plomo, durante 4 días, a ratas. El metal produjo un aumento en los fibroblastos de la médula y un descenso en los macrófagos, con lo que parecían confirmarse los resultados de Kowolenko et al (176).

Medimos de forma indirecta la acción del plomo sobre la producción de la línea monocito-macrofágica de la médula ósea, tras 70 días de exposición, a través de un recuento de los monocitos en sangre. Los monocitos circulaban en los grupos control y los expuestos en igual número, por lo que nos parece poco probable que la monopoiesis estuviese afectada en el momento de nuestro estudio.

La ausencia de esta inhibición en nuestro estudio y su presencia en las investigaciones de Kowolenko et al (176) y de Miszta (175), podría explicarse por la divergencias de resultados que produce este metal según la vía, tiempo y dosis de exposición, que eran distintas en los casos anteriores, y que ya han sido previamente descritas con otros efectos inmunomodulatorios del plomo (161).

Comparamos los efectos del plomo en peritoneo con los producidos en otro órgano, que interviene muy directamente en la absorción del metal y contiene gran número de macrófagos, el pulmón. Kaminsky et al (248), en exposición aguda a un óxido de plomo y Bingham et al (174), en exposición crónica, descubrieron un aumento y una disminución, respectivamente, en el número de macrófagos alveolares recuperados en rata.

Las distintas susceptibilidades de estas dos poblaciones celulares, la alveolar y la peritoneal, a los efectos del plomo sobre su número, podrían deberse a su diferente cinética proliferativa. Los macrófagos alveolares parecen ser una población de replicación

propia, ya que proliferan *in vitro* tras la estimulación de los CSF (249) y mantienen su número tras la extirpación de la médula ósea. Esta autorreplicación es sólo de 1/3 en la población peritoneal (246). El metal quizás actúe sobre la acción de los CSF en los órganos periféricos de igual forma que lo hace sobre la médula ósea (176) lo que convertiría a la población alveolar en más vulnerable.

También la gran heterogeneidad funcional y fenotípica de estos dos tipos de macrófagos, que parece ser reflejo del ambiente local (249), podría explicar la diferencia en su susceptibilidad al plomo. Los macrófagos alveolares son muy dependientes de procesos aerobios, y el plomo inhibe su metabolismo oxidativo (248, 250-252), por lo que son más vulnerables que los fagocitos de peritoneo.

Finalmente, las diferencias en la forma química de exposición, óxido de plomo en los macrófagos alveolares y acetato de plomo en los peritoneales, en la vía y la dosis del metal nos podrían explicar, de nuevo, la divergencia en los resultados (161).

7. EFECTOS DEL PLOMO SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

La medida de la viabilidad celular con técnicas de exclusión tintorial es una valoración general del estado celular, que indica la existencia o no de una disrupción de la membrana. Entre los colorantes vitales, empleados con este fin, el azul de tripano es el de uso más extendido, motivo por el que lo elegimos.

Nuestro análisis sobre la viabilidad de los macrófagos peritoneales de ratones, expuestos durante 10 semanas al acetato de plomo, demostró la ausencia de cambios significativos. Coincidimos con las investigaciones de Koller y Roan en macrófagos peritoneales de otras cepas de ratón (179) y las de Baginski en polimorfonucleares de humanos (169).

Nuestros resultados se diferenciaron, sin embargo, de los obtenidos en macrófagos peritoneales de ratones y cobayas expuestos *in vitro*, durante 24 horas (177, 178), en los

que sí se demostró una disminución de la viabilidad celular. También se diferenciaban de los obtenidos por Kaminsky et al (248) tanto *in vivo* como *in vitro*, en macrófagos alveolares.

En las investigaciones realizadas en las células peritoneales la concentración del metal fue más alta en los estudios realizados *in vitro* que en los verificados *in vivo*. La mínima concentración de metal que producía la disminución en la viabilidad celular en el estudio de Kiredmijan et al (178) fue semejante a la máxima empleada por nosotros.

Respecto a las diferencias de nuestros resultados con los hallados en los macrófagos alveolares, en estudios *in vivo*, deberíamos considerar las diferencias metabólicas entre estos fagocitos, que hacen a los alveolares mucho más dependientes del metabolismo oxidativo (248).

El plomo inhibe el consumo de oxígeno y el metabolismo oxidativo de los macrófagos alveolares a bajas concentraciones (0,12 mg/ml) (250, 251, 253). Concentraciones mayores (0,5 mg/ml) alterarían más intensamente el metabolismo celular, se dañaría la célula y se rompería su membrana (250).

8. INDICE DE ADHERENCIA

La adherencia y los mecanismos de reconocimiento celular son requerimientos básicos, tanto para la evolución de los organismos multicelulares como para el desarrollo de las capacidades de las células del sistema inmune.

Durante el desarrollo embrionario las proteínas celulares imparten la información específica que guía la emigración celular, la localización y la transferencia de información entre las células.

El sistema inmune está formado por un conjunto celular en el que los mecanismos de reconocimiento y las acciones defensivas de las células dependen del proceso de adherencia (254).

Medimos la adherencia de las células peritoneales y de los macrófagos expuestos al plomo. En ambos casos en el grupo expuesto a 1300 ppm se produjo una gran inhibición de la adherencia celular, siendo estas diferencias entre grupos significativas.

La comparación en el número de células peritoneales se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la de los macrófagos por ANOVA, que es una prueba paramétrica y tiene una mayor potencia para detectar los cambios ($p=0,0004$ y $p=0,00002$, respectivamente).

Se anotó la viabilidad celular al finalizar la prueba. Siempre fue superior al 95% por lo que se descartó que un mal estado celular fuera el responsable de la disminución de la adherencia. La concentración de 1300 ppm de plomo reducía la adherencia de las células peritoneales y macrofágicas.

Pensamos que una acción de este metal sobre las moléculas de adherencia o las integrinas de las células peritoneales y macrófagos, podría causar esta inhibición descubierta en el grupo expuesto a 1300 ppm. Las células de la línea monocito-macrofágica, y otros leucocitos, presentan un gran número de moléculas de adherencia: la LFA-1 o función del linfocito asociada con el antígeno 1, el MAC-1 o CR3 o antígeno 1 del macrófago y el p150,95 o CR4, que son integrinas. También tienen receptores para la fibronectina, vitronectina y la glicoproteína IIb (254).

Un hecho común a todas las integrinas es su alto contenido en cisteína, sobre todo en la subunidad β en la que representa un 7,4 % del total y en la región transmembránica donde aparece en un 20 %. El plomo tiene una alta afinidad por los grupos sulfhidrilos, pudiendo alterar de este modo estas moléculas de adherencia y modificar el **Índice de adherencia**. El hecho de que la mayor cantidad de grupos sulfhidrilos se sitúe en la región transmembránica (254) podría explicar su difícil acceso por el metal y que sólo la dosis más alta causara la inhibición de la adherencia.

Las subunidades α de las integrinas MAC-1, LFA-1 y p150,95 contienen 3 zonas de repeticiones homólogas en las que parecen existir puntos de unión para el Ca y el Mg, cationes que estabilizan las interacciones con las subunidades β y son necesarios para su actividad (254). El plomo, que es un catión divalente, podría competir con estos sitios de unión y conducir también de esta forma a una inhibición de la adherencia.

Según la bibliografía revisada, somos los primeros en medir los efectos del metal sobre la adherencia celular. Por este motivo, no hemos podido comparar directamente nuestros resultados con los de otros investigadores, aunque se han realizado descubrimientos que pueden corroborarlos.

Kowolenko et al (176) realizaron un cultivo de células de médula ósea a las que expusieron *in vitro* al metal y al factor de crecimiento CSF-1 (Factor estimulador de colonias macrofágicas). El número total de células recuperadas disminuía respecto a los controles, a expensas de la línea monocito-macrofágica. También observaron una disminución en la extensión citoplasmática de estas células. Se ha descubierto que las integrinas MAC-1 y p150,95 se movilizan tras la estimulación con el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (255), hecho que también podría ocurrir con otro factor de crecimiento el CSF-1. El plomo tal vez disminuiría la extensión citoplasmática de las células de la línea monocito-macrofágica, descubiertos por Kowolenko et al (176), y la adherencia apreciada por nosotros, mediante la inhibición de estas integrinas.

También se ha descubierto una disminución del aclaramiento de carbón coloidal en animales expuestos al plomo (133, 136). Loose et al (256) pensaron que la disminución del aclaramiento del carbón coloidal se correlacionaba con un descenso de la fibronectina plasmática, que es un ligando de la matriz extracelular estrechamente relacionado con el MAC-1, LFA-1 y p150,95 (249). Su posible alteración por el plomo podría conducir a esta inhibición en el aclaramiento del carbón coloidal y apoyaría la hipótesis de la modificación de las integrinas.

Otro mecanismo por el que el metal podría disminuir la adherencia, es provocando alteraciones en las membranas de los macrófagos (257). Kiredmijan et al (178) descubrieron una reducción en la movilidad electroforética de los macrófagos peritoneales expuestos *in vitro* al plomo, reducción que se relacionaba directamente con la concentración del metal. Parece que la alteración en la movilidad electroforética puede alterar la adherencia (258)

Valentino et al (89) observaron una disminución en la fluidez de membrana de los hematíes de los trabajadores expuestos al plomo, que explicaría el aumento de su microviscosidad. Si la rigidez de membrana se produjera también en los macrófagos, podría conducir a cambios cualitativos en las integrinas y a una disminución en su capacidad de adherencia.

9. INDICES DE QUIMIOTAXIS Y MOVILIDAD ESPONTANEA

Metchnikoff propuso en el siglo pasado que ciertas sustancias químicas, provenientes de focos con partículas extrañas, atraían a los leucocitos (259). Sin embargo la cuantificación de este proceso no fue posible hasta 1962, año en que Boyden publicó su técnica (213) con la que midió la emigración de leucocitos a través de los microporos de un filtro, en respuesta a un gradiente químico.

La presencia o ausencia de este gradiente químico distingue la quimiotaxis, o movilidad dirigida, de la movilidad espontánea de los leucocitos.

La quimiotaxis es necesaria para muchas de las acciones afectoras y efectoras del macrófago que están alteradas por el plomo (132, 144, 161, 176). Por esta causa realizamos una investigación sobre la actividad quimiotáctica y espontánea de las células de la línea monocito-macrofágica, que no habían sido estudiadas.

La exposición *in vivo* al plomo, durante 10 semanas, produjo la disminución de los **Indices quimiotácticos** de las células de los animales expuestos a 13 y 1300 ppm. Las

diferencias eran significativas, según la prueba ANOVA con una $p=0,038$. La prueba de Scheffé demostró que los grupos expuestos a 13 y 1300 ppm se diferenciaban de los controles y expuestos a 130 ppm, y producían esa diferencia estadística.

La movilidad espontánea disminuía, de forma no significativa, en las células de los ratones sometidos a 13 y 130 ppm, restaurándose para los expuestos a 1300 ppm.

Se registró la viabilidad celular final, tras las 4 horas de quimiotaxis y de movilidad espontánea, comprobándose el mantenimiento del adecuado estado celular hasta la terminación de ambas pruebas. Siempre fue superior al 95 % por lo que este factor no intervenía en los resultados obtenidos.

Se ha descubierto una disminución en la quimiotaxis de los neutrófilos de trabajadores expuestos al plomo, cuando se alcanzan concentraciones sanguíneas del metal de 60 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (170, 171, 172). Una concentración sanguínea semejante, 69,4 $\mu\text{g}/\text{dl}$, se obtiene en ratones Balb/c (149) expuestos a una dosis del metal 1,5 veces superior a la máxima nuestra (1300 ppm de plomo). Las células de la línea monocito-macrofágica de ratón parecen ser más susceptibles que los polimorfonucleares humanos, ya que su inhibición se inicia con una dosis de metal de 13 ppm (161).

La disminución en la quimiotaxis a dosis de 13 ppm de plomo, la recuperación a dosis de 130 ppm y la posterior inhibición no habían sido descubiertas hasta ahora, pero existen otras funciones de estas células que siguen un patrón similar. Así, Koller y Roan (179) hallaron una disminución inicial, seguida de estimulación consecutiva, en las fosfatasas ácidas de macrófagos peritoneales, y Lison et al (260) detectaron el mismo patrón de comportamiento en la actividad de la proteínquinasa C de macrófagos de peritoneo con disminución inicial, recuperación intermedia e inhibición final, que nosotros en la quimiotaxis. Koller y Roan (179) descubrieron, por otro lado, un aumento en la respuesta de linfocitos mezclados de ratones expuestos a 130 ppm.

La actividad quimiotáctica tiene 3 fases: unión de la sustancia quimioatrayente al receptor, fase de transmisión y fase de movilización hacia el gradiente quimiotáctico. Esta última requiere la activación energía-dependiente del aparato motor celular (261).

Tanto la dosis como la afinidad del quimioatrayente por el receptor, afectan a la actividad biológica de la unión sustancia quimiotáctica-receptor (245).

En muchos sistemas celulares las alteraciones de sus membranas modifican esta afinidad entre el receptor-hormona y los procesos metabólicos resultantes (262). También las variaciones en la membrana de los polimorfonucleares alteran la afinidad de los receptores quimiotácticos. Así, los alcoholes alifáticos, a bajas concentraciones, aumentan la fluidez de la membrana y la afinidad de los quimioatrayentes por el receptor, potenciando la emigración (245). Por el contrario, la anfotericina B (245), produce un desequilibrio en la proporción fosfolípidos-colesterol de la membrana y una disminución en la afinidad de los receptores quimiotácticos.

Se ha descubierto una disminución en la fluidez de membrana de los eritrocitos de trabajadores expuestos al plomo y una probable modificación en la relación entre los fosfolípidos y el colesterol (89). Si estas alteraciones se produjeran en las células de la línea monocito-macrofágica, disminuiría la afinidad de los quimioatrayentes por el receptor y por lo tanto la actividad quimiotáctica.

En la fase de transmisión, que sigue a la unión del quimioatrayente al receptor, se producen varios procesos bioquímicos, como son el aumento del Ca intracelular y del adenosín monofosfato cíclico (c-AMP), la polarización de la membrana y la activación de la proteínquinasa C. La polarización y la activación de la proteínquinasa C pueden inhibirse por el plomo (178, 260).

La carga eléctrica superficial de los macrófagos peritoneales se altera por este metal, reduciéndose su movilidad electroforética de forma dependiente a la concentración del metal (178). El plomo probablemente se une a las cargas eléctricas negativas de la

membrana, interfiriendo en el proceso de polarización y consecuentemente en la quimiotaxis.

Recientemente se ha identificado, en polimorfonucleares, la enzima proteínquinasa C, que en situación de inactividad está localizada en el citoplasma (259). Los quimioatrayentes liberan de los fosfolípidos de la membrana el ácido araquidónico, que activa a esta proteínquinasa C, que a continuación se traslada a la membrana (259) y participa en el acoplamiento del estímulo quimiotáctico. Lison et al (260) descubrieron una inhibición directa de la proteínquinasa C por el plomo. Con las dosis menores del metal ($0,1 \mu\text{M}$) disminuía su actividad, con las intermedias ($1 \mu\text{M}$) se recuperaba y con las dosis altas ($100\mu\text{M}$) se inhibía totalmente. La inhibición de esta enzima por el plomo también podría modificar la actividad quimiotáctica de la célula.

Una vez que la señal quimiotáctica se ha transmitido, la célula se orienta hacia la sustancia quimiotáctica, adquiere forma triangular, emite un pseudópodo en ese frente, conocido como lamelipodio, y un arrugamiento con retracción de fibras o urópodo, en el polo opuesto (245). Los microfilamentos forman una densa malla en el lamelipodio y el urópodo, mientras que los microtúbulos se encuentran en el citoplasma granular (235). Röderer et al (263) descubrieron una interferencia del plomo en la unión de los microtúbulos, que también podría contribuir a la disminución de la actividad quimiotáctica celular.

Una adherencia idónea (230) es necesaria para la ejecución óptima de la quimiotaxis. Su disminución, descubierta en nuestro estudio, podría ser otro mecanismo que alterase la quimiotaxis.

10. ADHERENCIA DE CANDIDA ALBICANS, FAGOCITOSIS Y PODER CANDIDICIDA

El macrófago, mediante su acción fagocítica, desempeña una importante defensa frente a los patógenos intracelulares, en un proceso dinámico en el que la partícula se une a la membrana del macrófago y luego es englobada.

Inicialmente, se establece un contacto entre el macrófago y la partícula a ingerir, favorecido por la existencia de receptores. Existen receptores para las opsoninas, ya para las fracciones F_c de las inmunoglobulinas IgG e IgA (F_c -GRI, F_c -GRII, F_c -GRIII y F_c -A), ya para el receptor C_{3b} del complemento (CR-1 o Receptor del complemento 1), el receptor C_{3bi} (CR-3) o el receptor C_{1q} del complemento. Otros receptores no son opsónicos, como los receptores para el manosil-fucosil, la fibronectina o los promotores de la adherencia LAF-1, MAC-1 y p150,95. Estos receptores no opsónicos actúan mediante la producción de cambios físico-químicos complejos, en el macrófago y en el patógeno (264).

Posteriormente, la partícula es englobada en un proceso en el que participan el Ca e interacciones complejas entre los filamentos de actina y miosina del interior de la célula y la membrana celular (245).

En un estadio más tardío la partícula es digerida a través de mecanismos oxidativos, desencadenantes de un estallido respiratorio (mieloperoxidasa dependientes o independientes) o de mecanismos no oxidativos, que conducen a la formación de fagolisosomas y a la degranulación de las proteínas catiónicas, la lactoferrina o la proteína que aumenta la permeabilidad de membrana (265).

Nos hemos propuesto medir estos eventos mediante 4 índices: **Índice fagocítico**, **Número medio de *C. albicans* por fagocito**, **Número de macrófagos con *C. albicans* adheridas** e **Índice candidicida**.

El **Número de macrófagos con *C. albicans* adheridas** disminuía, no significativamente, en los ratones expuestos a 1300 ppm de plomo, a un 77% del control.

El **Índice fagocítico**, o porcentaje de macrófagos que fagocitaban *C. albicans*, era semejante entre los grupos. Sin embargo, cuando valorábamos la fagocitosis por el **Número medio de *C. albicans* por fagocito**, ésta disminuía conforme aumentaba la exposición. Las diferencias eran estadísticamente significativas, mediante la prueba ANOVA, con una $p=0,018$. Realizando la prueba de Scheffé obteníamos 2 grupos homogéneos de resultados. El grupo formado por el control y las dosis de exposición de 13 y 130 ppm eran semejantes entre sí, y también el constituido por las 3 dosis, 13, 130 y 1300 ppm de plomo. Las diferencias se debían, por lo tanto, a los resultados del grupo control y grupo de 1300 ppm.

El **Índice candidicida**, o porcentaje de *C. albicans* fagocitadas y muertas, era semejante en los 4 grupos.

La viabilidad de los macrófagos era semejante en todos los grupos, y también la viabilidad de las *C. albicans*, por lo que estos factores no contribuían a la alteración de los anteriores resultados.

Nuestra investigación descubrió una "tendencia" a la disminución, en el grupo expuesto a 1300 ppm, de la adherencia de *C. albicans* a macrófagos peritoneales, que no era estadísticamente significativa, pero fue un 77% del control. El grupo expuesto a 130 ppm, tenía una gran dispersión de resultados, dispersión que minimizaba las diferencias entre el resto de los grupos y contribuía a que no fueran significativas.

La "tendencia" a la inhibición en la adherencia del grupo de 1300 ppm concuerda con el descubrimiento de Jian et al (180), quienes encontraron un importante descenso en la adherencia de hematíes de carnero a macrófagos alveolares expuestos al metal. La menor susceptibilidad de las células peritoneales podría explicarse por las diferencias metodológicas, de especie y de tipo de macrófago (161).

La existencia de posibles alteraciones en los macrófagos de nuestro experimento, como las demostradas previamente en estos fagocitos, en cuanto a sus propiedades físico-eléctricas (178), sus receptores promotores de adherencia (176), sus receptores para la fracción F_c de las inmunoglobulinas (180) o en la afinidad de los mismos (262, 89), nos podrían explicar esta "tendencia" a la disminución de la adherencia de *C. albicans* en el grupo de 1300 ppm.

Hemos descubierto que mientras que el número de células que fagocitan es el mismo en los grupos expuestos que en los controles, su capacidad de ingesta es menor, teniendo menos *C. albicans* fagocitadas por célula. Este hecho concuerda con la disminución en la fagocitosis de polimorfonucleares de humanos expuestos *in vitro* al metal (169) o el retraso en la producción de quimioluminiscencia de granulocitos de trabajadores en las industrias del metal (171).

Los posibles mecanismos causales de esta inhibición en la actividad fagocítica por el plomo son varios. En primer lugar el daño causado por este metal en las ATPasas de la membrana (158) o en las ATPasas de la miosina (266) podría actuar bloqueando la unión entre los microtúbulos del interior del macrófago, formados por miosina (265), y la actina de su membrana, unión necesaria para la internalización del hongo. Por otro lado el plomo inhibe el ensamblaje de los microtúbulos (266), lo que podría explicar también esta deficiencia en la internalización del patógeno.

El metabolismo oxidativo participa en la acción fagocítica y germicida de los fagocitos. Los macrófagos activados tienen estas acciones más altas que los residentes, en parte por su mayor metabolismo oxidativo. Así, en la acción candidicida oxígeno-dependiente, intervienen fundamentalmente el O_2^- (267) y el H_2O_2 , que son mucho menor y prácticamente inexistentes, respectivamente, en los macrófagos residentes. Por otro lado, dentro de los mecanismos microbicidas oxígeno-independientes la lisozima y otras proteínas lisosómicas, aún no bien determinadas, desempeñan una importante acción

candidicida (267), ya que la *C. albicans* es más resistente que otras especies a la acción de los mecanismos oxidativos. La *C. albicans* disminuye la estimulación del metabolismo oxidativo del macrófago tras su contacto (268), por lo que estos mecanismos oxígeno-independientes adquieren singular relevancia para su acción candidicida.

Nuestros resultados demuestran la no alteración de la acción candidicida de los macrófagos residentes peritoneales por el plomo. Sin embargo, se ha descubierto una disminución del metabolismo oxidativo de macrófagos alveolares expuestos *in vivo* y de macrófagos peritoneales expuestos *in vitro* al metal (177, 250, 251). Como los fagocitos alveolares son más dependientes del metabolismo oxidativo que los peritoneales (248) y los macrófagos peritoneales en los que se descubrió esta inhibición se expusieron *in vitro* (161), la susceptibilidad de este metabolismo al plomo podría ser diferente en estos dos estudios que en el nuestro, realizado con macrófagos peritoneales expuestos *in vivo*.

Por otro lado, estos resultados son también divergentes con los encontrados en granulocitos sanguíneos, en los que desciende la acción microbicida por la inhibición de la enzima mieloperoxidasa, enzima que amplifica la acción germicida oxígeno-dependiente, y del mecanismo de yodación asociado a ésta (168). Sin embargo, los macrófagos residentes peritoneales carecen de esta enzima en sus gránulos.

Coincidimos con los resultados de Kowolenko et al (181) que no encontraron cambios en la fagocitosis de *Listeria* por los macrófagos peritoneales expuestos al plomo.

Koller y Roan (179) descubrieron, a su vez, un aumento en la fagocitosis y en la actividad de la fosfatasa ácida de los macrófagos peritoneales expuestos al metal. La fosfatasa ácida, las proteínas catiónicas, la lisozima y la proteína que aumenta la permeabilidad de membrana (269) forman parte de los gránulos azurrófilos. Quizás el plomo aumente estos mecanismos microbicidas oxígeno-independientes, que son de gran importancia en las células residentes y compense su inhibición de los oxígeno-dependientes, consiguiendo que la acción candidicida final permanezca inalterada.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El plomo no modifica, tras una exposición de 10 semanas y a las dosis utilizadas, el número de células peritoneales.
2. La viabilidad de las anteriores células no se ve comprometida por el metal.
3. La composición celular peritoneal, tampoco se altera.
4. La adherencia de las células blancas referidas y de los macrófagos residentes se modifica, disminuyendo, a la dosis de 1300 ppm de plomo. Permanece estable con las de 13 y 130 ppm.
5. La quimiotaxis macrofágica disminuye con las exposiciones de 13 y 1300 ppm, permaneciendo inalterada con la de 130 ppm.
6. La movilidad espontánea no varía, con ninguna de las dosis utilizadas, 13, 130 y 1300 ppm de plomo.
7. El número de células que fagocitan *C. albicans* no se afecta por el metal, pero sí el número de hongos ingeridos por célula, que disminuye con la exposición a 1300 ppm.

8. El número de *C. albicans* adheridas a los macrófagos no se compromete por el plomo.

9. El número de *C. albicans* digeridas por fagocito permanece inalterado por la exposición al metal.

El estudio de la exposición a dosis mantenidas de plomo en el modelo murino permite conocer sus efectos en la etapa subclínica para desarrollar futuras medidas diagnósticas, terapéuticas y preventivas. Por tanto, creemos conveniente continuar esta investigación con estudios diseñados para obtener conclusiones válidas en humanos.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. *Environmental Health Criteria: 3. Lead*. World Health Organization, Geneva, 1977: 10, 39, 47, 55, 74, 77.
2. Villanueva E. Plomo. En: Gisbert JA, editor. *Medicina legal y toxicología*. Barcelona: Salvat, 1991: 728-41.
3. Huel G, Boudène C, Jouan M, Lazar P. Assessment of exposure to lead of the general population in the French community through biological monitoring. *Int Arch Occup Environ Health* 1986; 58: 131-9.
4. Claeys-Thoreau F, Bruaux P, Ducoffre G, Lanfontaine A. Exposure to lead of the Belgian population. *Int Arch Occup Environ Health* 1983; 3: 109-17.
5. Eldwood PC, Gallacher JEJ, Phillips KM, Davies BE, Toothill C. Greater contribution to blood lead from water than from air. *Nature* 1984; 310: 138-40.
6. Luque R, Gutierrez-Rave M, Pujol E. Saturnismo familiar por ingesta de agua domiciliaria. *An Med Intern (Madrid)* 1989; 6: 660-1.
7. Otero A, Mora B, Cao M, Rodríguez L. Epidemiología de la intoxicación por agua domiciliaria y saturnismo. Valoración de parámetros para el estudio de grandes poblaciones. *Rev San Hig Púb* 1987; 61: 799-810.
8. Bois FY, Tozer TN, Zeise L, Benet LZ. Application of clearance concepts to the assesment of exposure to lead in drinking water. *AJPH* 1989; 79: 827-31.
9. Collarte MB, Mato J, Rodríguez L. Una investigación sociosanitaria sobre exposición al plomo y saturnismo en la ciudad de Orense. *Rev San Hig Pub* 1982; 56: 212-61.

10. Kaminsky P, Leone J, Duc M. Incidence du saturnisme hydrique dans un service de médecine interne en région de sols acides. *Presse Méd* 1988; 17: 419-22.
11. Krelowska-Kulas M. Lead, cadmium, iron, copper and zinc in fresh milk from the selected areas of the Cracow region. *Die Nahrung* 1990; 3: 213-7.
12. Shannon MW, Graef JW. Lead intoxication in infancy. *Pediatrics* 1992; 89: 87-90.
13. Van Dokkum W, De Vos RH, Muys TH, Wesstra JA. Minerals and trace elements in total diets in The Netherlands. *Br J Nutr* 1989; 61: 7-15.
14. Becker W, Kumpulainen J. Contents of essential and toxic mineral elements in Swedish market-basket diets in 1987. *Br J Nutr* 1991; 66: 151-60.
15. Vahter M, Berglund M, Lind B, Jorhem L, Slorach S, Friberg L. Personal monitoring of lead and cadmium exposure. A Swedish study with special reference to methodological aspects. *Scand J Work Environ Health* 1991; 17: 65-74.
16. Claeys-Thoreau F, Thiessen L, Bruaux P, Ducoffre G, Verduyn G. Assessment and comparison of human exposure to lead between Belgium, Malta, Mexico and Sweden. *Int Arch Occup Environ Health* 1987; 59: 31-41.
17. Ureña ME, Giménez J, Cano JM. Estudio del contenido de trazas de hierro, manganeso, cobre, plomo, cinc, cadmio y cobalto en los vinos de Málaga. *Alimentaria* 1987;; 83-6.
18. Fernández Pereira C, Martín A. Contenido en elementos metálicos de vinos españoles. *Alimentaria* 1987;; 75-82.
19. Grilo A, López-Artíguez M, Castilla L, Castro M, García-Bragado F, Repetto M. El vino como fuente contaminante de plomo: estudio en el área sur de Sevilla. *Med Clin (Barc)* 1990; 95: 281-5.

20. Morales C, Escudero D, Tuyet J. Intoxicación crónica por plomo debida a ingesta de vino a granel (Carta). *Med Clin (Barc)* 1985; 85: 815-6.
21. Campins M, Selva A, Domínguez C et al. Intoxicación crónica por plomo debida al consumo de vino: estudio epidemiológico. *Med Clin (Barc)* 1990; 94: 218-20.
22. Graziano JH, Blum C. Exposición al plomo por cristal de sosa. *Lancet (Ed. esp.)* 1991; 18: 344-5.
23. Marks V, Taylor A. Lead foil on wine bottles (Letter). *Lancet* 1987; 2: 1473-4.
24. Center for Disease Control. Elevated blood lead levels associated with illicitly distilled alcohol. Alabama 1990-1991. *MMWR* 1992; 41: 294-5.
25. Arvanitoyannis L. The effect of storage of canned juices on content of the metals Fe, Cu, Zn, Pb, Sn, Al, Cd, Sb and Ni. *Die Nahrung* 1990; 2: 141-5.
26. Cullen MR, Robins JM, Eskenazi B. Adult inorganic lead intoxication: presentation of 31 new cases and a review of recent advances in the literature. *Medicine* 1984; 62: 221-47.
27. Zuckerman MA. Exposición al plomo por cristal de sosa. *Lancet (Ed Esp)* 1991; 19: 62.
28. Martínez de Letona J, Pérez R, Masa C, Ferriz P, Elviro P, Pérez R. Intoxicación saturnina a partir de una vasija de barro vidriado. *Rev Clin Esp* 1982; 164: 413-5.
29. Gutiérrez JA, Abad J, Santa JM, Díaz JM, Pérez FJ, Coca S. Un caso de saturnismo en el ambiente doméstico (Carta). *Med Clin (Barc)* 1984; 82: 282.
30. San Miguel A, Rodríguez J, Morchón LA, Fernández N, Pérez de Diego I, Merino J. Intoxicación por plomo. Estudio comparativo de saturnismo agudo por distintas fuentes (Carta). *Med Clin (Barc)* 1986; 86: 611-2.

31. Grilo A, Palomera L, García de Jalón A, Barbudo A, García I, Criado A. Saturnismo inducido por la ingestión de aceitunas aliñadas en vasijas de barro vitrificadas: estudio epidemiológico en la comarca Cabra-Lucena. *Med Clin (Barc)* 1986; 86: 410-3.
32. San Miguel A, Barbero JR, Diego A, Illescas JJ, Fernández A, Pérez I. Saturnismo: complicaciones diagnósticas de la evolución en la intoxicación aguda por plomo. *An Clin* 1987; 49: 283-6.
33. Trotter RT. The cultural parameters of lead poisoning: a medical anthropologist's view of intervention in environmental lead exposure. *Environ Health Perspect* 1990; 89: 79-84.
34. Hernández M, Romieu I, Rios C, Rivero A, Palazuelos A. Lead-glazed ceramics as major determinants of blood lead levels in mexican women. *Environ Health Perspect* 1991; 94: 117-20.
35. Algora M, Martín-Castillo A, Zabala P, Fernández MN. Saturnismo por drogadicción: nueva fuente de intoxicación con el interés clínico e importantes consecuencias epidemiológicas. *An Med Intern (Madrid)* 1989; 6: 483-5.
36. Carton JA. Saturnismo: epidemiología y diagnóstico. *Med Clin (Barc)* 1985; 84: 492-9.
37. Center for Disease Control. Lead poisoning associated with intravenous methamphetamine use. Oregon 1988. *MMWR* 1990; 263: 797-8.
38. Alcott J, Barnhart RA, Mooney LA. Acute lead poisoning in two users of illicit metamphetamine. *JAMA* 1987; 258: 510-1.
39. Brockaus A, Freier I, Ewers U, Jermann E, Dolgner R. Levels of cadmium and lead in blood in relations to smoking, sex, occupation, and others factors in a adult population of the FRG. *Int Arch Occup Environ Health* 1983; 52: 167-75.

40. Bellinger D, Leviton A, Wateraux Ch, Needleman H, Rabinowitz M. Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *N Eng J Med* 1987; 316: 1037-43.
41. Slavin RE, Swedo J, Cartwright J, Viegas S, Custer EM. Lead arthritis and lead poisoning following bullet wounds: a clinicopathologic, ultrastructural, and microanalytic study of two cases. *Hum Pathol* 1988; 19: 223-35.
42. Benevich T. New sources add to lead poisoning concerns. *JAMA* 1990; 263: 790-1.
43. World Health Organization. *Environmental Health Criteria: 85: Lead*. World Health Organization, Geneva, 1989: 82.
44. Center for Disease Control. State activities for prevention of lead poisoning among children. United States 1992. *MMWR* 1993; 42: 165, 171-2.
45. Rabinowitz MB, Wang J, Soong W. Dentine lead and child intelligence in Taiwan. *Arch Environ Health* 1991; 46: 351-60.
46. Kaye W, Novotny TE, Tucker M. New ceramics related industry implicated in elevated blood lead levels in children. *Arch Environ Health* 1987; 42: 161-4.
47. Brockhaus A, Collet W, Dolgner R et al. Exposure to lead and cadmium of children living in different areas of North-West Germany: results of biological monitoring studies 1982-1986. *Int Arch Occup Environ Health* 1988; 60: 211-22.
48. Center for Disease Control. Childhood lead poisoning. United States: report to the Congress by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *MMWR* 1988; 37: 481-5.
49. Sedman RM. The development of applied action levels for soil contact: a scenario for the exposure of humans to soil in a residential setting. *Environ Health Perspect* 1989; 79: 291-313.

50. Thornton I, Davies DJA, Watt JM, Quinn MJ. Lead exposure in young children from dust and soil in the United Kingdom. *Environ Health Perspect* 1990; 89: 55-60.
51. Parry C, Eaton J. Kohl: a lead hazardous eye makeup from the third world to the first world. *Environ Health Perspect* 1991; 94: 121-3.
52. Center for Disease Control. Lead exposure among lead burners. Utah, 1991. *MMWR* 1992; 41: 307-10.
53. Baghurst PA, McMichael AJ, Wigg NR et al. Environmental exposure to lead and children's intelligence at the age of seven years. The Port Pirie Cohort study. *N Eng J Med* 1992; 327: 1279-84.
54. Center for Disease Control. Surveillance of elevated blood lead levels among adults. United States, 1992. *MMWR* 1992; 41: 285-7
55. Carton JA. Saturnismo 1988. *Med Clin (Barc)* 1988; 91: 538-40.
56. Quer S, Sanz P, Reig R, Boix D, Nogue S, Corbella J. Fuentes contaminantes en la exposición al plomo: aportación de 24 casos de saturnismo de etiología diversa. *Rev San Hig Publ* 1988; 62: 1635-44.
57. Goldman RH, Baker EL, Hannan M, Kamerow DB. Lead poisoning in automobile radiator mechanics. *N Eng J Med* 1987; 317: 214-8.
58. Hodgkins DG, Hinkamp DL, Robins TG, Schork A, Krebs WH. Influence of high past lead in air exposures on the lead in blood levels of lead acid battery workers with continuing exposure. *J Occup Med* 1991; 33: 797-803.
59. McMichael AJ, Baghurst PA, Wigg NV, Vimpani GV, Robertson EF, Roberts RJ. Port Pirie Cohort Study: environmental exposure to lead and children's abilities at the age of four years. *N Eng J Med* 1988; 319: 468-75.

60. Mahaffey KR, Annest JL, Roberts J, Murphy RS. National estimates of blood lead levels: United States, 1976-80. Association with selected demographic and socioeconomic factors. *N Eng J Med* 1982; 307: 573-9.
61. Sartor F, Rondia D. Blood lead levels and age: a study in two male urban populations not occupationally exposed. *Arch Environ Health* 1980; 35: 110-6.
62. Arnetz BB, Nicolich MJ. Modelling of environmental lead contributors to blood lead in humans. *Int Arch Occup Environ Health* 1990; 62: 397-402.
63. Lin-Fu JS. Children and lead. New findings and concerns. *N Eng J Med* 1982; 307: 615-7.
64. Annest J, Pirkle JL, Makuc D, Neese JW, Bayse DD, Kovar MG. Chronological trend in blood lead levels between 1976 and 1980. *N Eng J Med* 1983; 308: 1373-7.
65. Sullivan MF, Ruemmler PS. Effect of excess Fe on Cd or Pb absorption by rats. *J Toxicol Environ Health* 1987; 22: 131-9.
66. Rabinowitz MB, Kopple JD, Wetherill GW. Effect of food intake on gastrointestinal lead absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 1784-8.
67. Schweinsberg F, von Karsa L. Heavy metals concentrations in humans. *Comp Biochem Physiol* 1990; 95 C: 117-23.
68. Fullmer CS. Intestinal lead and calcium absorption: effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol and lead status. *PSEBM* 1990; 194: 258-64.
69. Aungst BJ, Dolce JA, Fung H-L. The effect of dose on the disposition of lead in rats after intravenous and oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 61: 48-57.

70. Rabinowitz MB, Wetherill GW. Lead metabolism in the normal human: stable isotope studies. *Science* 1973; 182: 725-7.
71. Hamilton DL. Interrelationships of lead and iron retention in iron deficient mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978; 46: 651-61.
72. Shukla A, Agarwai KN, Shukla GS. Effect of latent iron deficiency on the levels of iron, calcium, zinc, copper, manganese, cadmium and lead in liver, kidney and spleen of growing rats. *Experientia* 1990; 46: 751-2.
73. Keller ChA, Doherty RA. Effect of dose on lead retention and distribution in suckling and adult female mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 52: 285-93.
74. Henning SJ, Cooper LC. Intestinal accumulation of lead salts and milk lead by suckling rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988; 187: 110-6.
75. Beach JR, Henning SJ. The distribution of lead in milk and the fate of milk lead in the gastrointestinal tract of suckling rats. *Pediatr Res* 1988; 23: 58-62.
76. Lee WR. What happens in lead poisoning?. *J R Col Physic Lond* 1981; 15: 48-54.
77. Ritz E, Mann J, Stoeppler M. Lead and the kidney. *Adv Nephrol* 1988; 17: 241-74.
78. Moore MR. Hematological effects of lead. *Sci Tot Environ* 1988; 71: 419-31.
79. Hammond PB. Lead poisoning. An old problem with a new dimension. En: Blood FR, editor. *Essays in toxicology*. New York: Academic Press, 1969: 116-55.
80. Dally S, Duvelleroy M, Conso F, Fournier E. Simulation d'intoxications chroniques: l'exemple du plomb. *Arch Mal Prof* 1980; 41: 129-35.
81. Rabinowitz MB, Wetherill GW, Kopple JD. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest* 1976; 58: 260-70.
82. Gross SB. Classifying lead body burdens using z scores. *Toxicol Appl Pharmacol* 1976; 38: 345-55.

83. Grazziano JH, Popovac D, Factor-Litvak P et al. Determinants of elevated blood lead during pregnancy in a population surrounding a lead smelter in Kosovo, Yugoslavia. *Environ Health Perspect* 1990; 89: 95-100.
84. Davis JM, Svendsgaard DJ. Lead and child development. *Nature* 1987; 329: 297-300.
85. Goyer RA. Transplacental transport of lead. *Environ Health Perspect* 1990; 89: 101-5.
86. Bradbury MWB, Deane R. Brain endothelium and interstium as sites for effects of lead. *Ann N Y Acad Sci* 1986;:1-8.
87. De Bruin A. Certain biological effects of lead upon the animal organism. *Arch Environ Health* 1971; 23: 249-64.
88. Autonowicz J, Andrzejak R, Smolik R. Influence of heavy metal mixtures on erythrocyte metabolism. *Int Arch Occup Environ Health* 1990; 62: 195-8.
89. Valentino M, Fiorini RM, Curatola G, Governa M. Changes of membrane fluidity in erythrocytes of lead exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1982; 51: 105-112.
90. Brunet M, Vives JL, Torra M et al. Valoración de la actividad pirimidina 5 nucleotidasa eritrocitaria en la detección y diagnóstico temprano del saturnismo. Estudio comparativo con la cinc-protoporfirina. *Med Clin (Barc)* 1988; 91: 521-4.
91. Clark M, Royal J, Seeler R. Interaction of iron deficiency and lead and the hematological deficiency and lead and the hematologic findings in children with severe lead poisoning. *Pediatrics* 1988; 81: 247-54.
92. Stollery BT, Broadbent DE, Banks HA, Lee WR. Short term prospective study of cognitive functioning in lead workers. *B J Ind Med* 1991; 48: 739-49.

93. Sjögren B, Gustavsson P, Hogstedt Ch. Neuropsychiatric symptoms among welders exposed to neurotoxic metals. *Br J Ind Med* 1990; 47: 704-7.
94. Needleman HL, Gunnoe C, Leviton A et al. Deficits in psychological and classroom performance in children with elevated dentine lead levels. *N Eng J Med* 1979; 300: 689-95.
95. Lyngbye T, Hansen ON, Trillingsgaard A, Beese I, Grandjean Ph. Learning disabilities in children: significance of low level lead exposure and confounding factors. *Acta Paediatr Scand* 1990; 79: 352-60.
96. Needleman HL, Gatsonis CA. Low level lead exposure and the IQ of children. A metaanalysis of modern studies. *JAMA* 1990; 263: 673-8.
97. Bellinger D, Sloman J, Leviton A, Rabinowitz M, Needleman HL, Wateraux Ch. Low level lead exposure and children's cognitive function in the preschool years. *Pediatrics* 1991; 87: 219-27.
98. Goldstein GW. Lead poisoning and brain cell function. *Environ Health Perspect* 1990; 89: 91-4.
99. Clarkson TW. Metal toxicity in the central nervous system. *Environ Health Perspect* 1987; 75: 59-64.
100. Verity MA. Comparative observations on inorganic and organic lead neurotoxicity. *Environ Health Perspect* 1990; 89: 43-8.
101. Silbergeld EK, Lamon JM. Role of altered heme synthesis in lead neurotoxicity. *J Occup Med* 1980; 22: 680-4.
102. Seppäläinen AM, Tola S, Hernberg S, Kock B. Subclinical neuropathy at "safe" levels of lead exposure. *Arch Environ Health* 1975; 30: 180-3.

103. Landrigan PhJ. Current issues in the epidemiology and toxicology of occupational exposure to lead. *Environ Health Perspect* 1990; 89: 61-6.
104. Clèdes J, Allain P. Néphropathie saturnine chronique. *Epidémiologie et diagnostic. Presse Méd* 1992; 21: 759-62.
105. Tepper LLB. Renal function subsequent to childhood plumbism. *Arch Environ Health* 1963; 7: 82-91.
106. Malcom D, Barnett HA. A mortality study of lead workers 1925-76. *Br J Ind Med* 1982; 39: 404-10.
107. McMichael AJ, Johnson HM. Long term mortality profile of heavily exposed lead smelter workers. *J Occup Med* 1982; 24: 375-8.
108. Cooper C. Deaths from chronic renal disease in U.S. battery and lead production workers. *Environ Health Perspect* 1988; 78: 61-3.
109. Slevan SG, Landrigan PhJ, Stern FB, Jones JH. Mortality of lead smelter workers. *Am J Epidemiol* 1985; 122: 673-83.
110. Gerhardsson L, Chettle DR, Englyst V et al. Kidney effects in long term exposed lead smelter workers. *Br J Ind Med* 1992; 49: 186-92.
111. Harlan WR. The relationship of blood lead levels to blood pressure in the U.S. population. *Environ Health Perspect* 1988; 78: 9-13.
112. Schwartz J. The relationship between blood lead and blood pressure in the NHANES II Survey. *Environ Health Perspect* 1988; 78: 15-22.
113. Schwartz J. Lead, blood pressure, and cardiovascular disease in men and women. *Environ Health Perspect* 1991; 91: 71-5.
114. Vander AJ. Chronic effects of lead on the renin-angiotensin system. *Environ Health Perspect* 1988; 78: 77-83.

115. Jacquet P. Influence de la progestérone et de l'estradiol exogènes sur le processus de l'implantation embryonnaire, chez la souris femelle intoxiquée par le plomb. *C R Soc Biol* 1978; 172: 1037-40.
116. Maisin JR, Lambiet-Collier M, De Saint-Georges L. Toxicité du plomb pour les embryons de la Souris. *C R Soc Biol* 1978; 172: 1041-3.
117. McGiven R, Sokol RZ, Berman NG. Prenatal lead exposure in the rat during the third week of gestation: long term behavioral, physiological, and anatomical effects associated with reproduction. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 110: 206-15.
118. Cullen MR, Kayne RD, Robins JM. Endocrine and reproductive dysfunction in men associated with occupational inorganic lead intoxication. *Arch Environ Health* 1984; 39: 431-40.
119. Assennato G, Paci C, Baser ME et al. Sperm count suppression without endocrine dysfunction in lead exposed men. *Arch Environ Health* 1986; 4: 387-90.
120. Schwartz J, Angle C, Pitcher H. Relationship between childhood blood lead levels and stature. *Pediatrics* 1986; 77: 281-8.
121. Carton JA, Maradona JA, Arribas JM. Acute-subacute lead poisoning. Clinical findings and comparative study of diagnostic tests. *Arch Intern Med* 1987; 147: 697-703.
122. Spivey GH, Brown P, Baloh RW et al. Subclinical effects of chronic increased lead absorption. A prospective study. *J Occup Med* 1979; 21: 423-9.
123. Slavin RE, Swedo J, Cartwright J, Viegas S, Custer EM. Lead arthritis and lead poisoning following bullet wounds: a clinicopathologic, ultrastructural, and microanalytic study of two cases. *Hum Pathol* 1988; 19: 223-35.
124. Berg JW, Burbank F. Correlations between carcinogenic trace metals in water supplies and cancer mortality. *Ann N Y Acad Sci* 1972; 199: 249-64.

125. Cooper WC, Wong O, Kheifets L. Mortality among employees of lead battery plants and lead producing plants, 1947-80. *Scand J Work Environ Health* 1985; 11: 331-45.
126. Kauppinen T, Riala R, Seitsamo J, Hernberg S. Primary liver cancer and occupational exposure. *Scand J Work Environ Health* 1992; 18: 18-25.
127. Steinberg EP, Sheppard PS. Lead is it carcinogenic?. *Public Health Rev* 1983; 11: 177-92.
128. Gerharsson L, Lundström NG, Nordberg G, Wall S. Mortality and lead exposure: a retrospective cohort study of Swedish smelter workers. *Br J Ind Med* 1986; 43: 707-12.
129. Van Esch GJ, Kroes R. The induction of renal tumours by feeding basic lead acetate to mice and hamsters. *Br J Cancer* 1969; 23: 765-71.
130. Kobayashi N, Okamoto T. Effects of lead oxide on the induction of lung tumours in syriam hamsters. *J Natl Cancer Inst* 1974; 52: 1605-10.
131. Selye H, Yuchweber B, Bertók L. Effect of lead acetate on the susceptibility of rats to bacterial endotoxins. *J Bacteriol* 1966; 91: 884-90.
132. Trejo RA, Di Luzio NR. Impaired detoxification as a mechanism of lead acetate induced hypersensitivity to endotoxin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 136: 889-93.
133. Filkins JP, Buchanan BJ. Effects of lead acetate on sensitivity to shock, intravascular carbon and endotoxin clearances, and hepatic endotoxin detoxification. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 142: 471-9.
134. Cook JA, Hoffmann EO, Di Luzio NR. Influence of lead and cadmium on the susceptibility of rats to bacterial challenge. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; 150: 741-7.

135. Cook JA, Di Luzio NR, Hoffman EO. Factors modifying susceptibility to bacterial endotoxin: the effect of lead and cadmium. *CRC Critic Rev Toxicol* 1975; 4: 201-29.
136. Cheadle WG, Ausobsky JR, Trachtenberg LS, Lamont P, Polk HC. Effects of muramyl dipeptide and lead acetate on carbon clearance and endotoxin induced mortality in mice. *Am Surg* 1986; 52: 613-7.
137. Dentener MA, Greeve JW, Maessen JG, Buurman WA. Role of tumor necrosis factor in the enhanced sensivity of mice to endotoxin after exposure to lead. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1989; 11: 321-34.
138. Gainer JH. Effects of heavy metals and of deficiency of zinc on mortality rates in mice infected with encephalomyorcaditis virus. *Am J Vet Res* 1977; 38: 869-72.
139. Exon JH, Koller LD, Kerkvliet I. Lead cadmium interaction: effects on viral induced mortality and tissue residues in mice. *Arch Environ Health* 1979; 34: 469-75.
140. Gainer JH. Activation of the Rauscher leukemia virus by metals. *J Natl Cancer Ints* 1973; 51: 609-13.
141. Koller LD. Immunosuppression produced by lead, cadmium, and mercury. *Am J Vet Res* 1973; 34: 1457-8.
142. Koller LD, Kovacic S. Decreased antibody formation in mice exposed to lead. *Nature* 1974; 250: 148-50.
143. Koller LD, Exon JH, Roan JG. Humoral antibody response in mice after single dose exposure to lead or cadmium. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976; 151: 339-42.
144. Blakley BR, Archer DL. The effect of lead acetate on the immune response in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 61: 18-26.

145. Neilan BA, Taddeini L, McJilton CE, Handwerger BS. Decreased T cell function in mice exposed to chronic, low levels of lead. *Clin Exp Immunol* 1980; 39: 746-9.
146. Koller LD, Exon JH, Moore SA, Watanabe PhG. Evaluation of ELISA for detecting *in vivo* chemical immunomodulation. *J Toxicol Environ Health* 1983; 11: 15-22.
147. Lawrence DA. *In vivo* and *in vitro* effects of lead on humoral and cell mediated immunity. *Infect Immun* 1981;31: 136-43.
148. Hillan RP, Ozkan AN. Comparison of local and systemic immunity after intratracheal, intraperitoneal, and intravenous immunization of mice exposed to either aerosolized or ingested lead. *Environ Res* 1986; 39: 265-77.
149. Mudzinski SP, Rudofsky UH, Mitchell DG, Lawrence DA. Analysis of lead effects on *in vivo* antibody mediated immunity in several mouse strains. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 83: 321-30.
150. Yoshida K, Sakura H, Toyama T. Immunological parameters in lead workers. *Jap J Ind Health* 1980; 22: 488-93.
151. Coscia GC, Discalzi G, Ponzetti C. Immunological aspects of occupational lead exposure. *Med Lav* 1987; 78: 360-4.
152. Ewers U, Siller-Winkler R, Idel H. Serum immunoglobulin, complement C3, and salivary IgA levels in lead workers. *Environ Res* 1982; 29: 351-7.
153. Reigart JR, Graber ChD. Evaluation of the humoral immune response of children with low level lead exposure. *Bull Environ Contam Toxicol* 1976; 16: 112-7.
154. Kimber I, Stonard MD, Gidlow DA, Niewola Z. Influence of chronic low level exposure to lead on plasma immunoglobulin concentration and cellular immune function in man. *Int Arch Occup Environ Health* 1986; 57: 117-25.

155. Faith RE, Luster MI, Kimmel CA. Effect of chronic developmental lead exposure on cell mediated immune functions. *Clin Exp Immunol* 1979; 35: 413-20.
156. Müller S, Gillert KE, Krause Ch, Gross U, L'Age-Stehr J, Diamantstein T. Suppression of delayed type hypersensitivity of mice by lead. *Experientia* 1977; 33: 667-8.
157. Lawrence DA. Heavy metal modulation of lymphocyte activities. *In vitro* effects of heavy on primary humoral immune responses. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 57: 439-51.
158. Gaworski CL, Sharma RP. The effects of heavy metals on [³H] thymidine uptake in lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978; 46: 305-13.
159. Blakley BR, Archer DL. Mitogen stimulation of lymphocytes exposed to lead. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982; 62: 183-9.
160. Lawrence DA. *In vivo* and *in vitro* effects of lead on humoral and cell mediated immunity. *Infect Immun* 1981; 31: 136-43.
161. Koller LD. The immunotoxic effects of lead in lead exposed laboratory animals. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 587: 160-7.
162. Exon JH, Talcott PA, Koller LD. Effect of lead, polychlorinated biphenyls, and cyclophosphamide on rat natural killer cells, interleukin 2, and antibody synthesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985; 5: 158-64.
163. Neilan BA, O'Neill K, Handwerger BS. Effect of low level lead exposure on antibody dependent and natural killer cell mediated cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983; 69: 272-5.
164. Cohen N, Modai D, Golik A et al. Increased concanavalin A induced suppressor cell activity in humans with occupational lead exposure. *Environ Res* 1989; 48: 1-6.

165. Jaremin B. Blast lymphocyte transformation (LTT), rosette (E-RFC) and leukocyte migration inhibition (MIF) tests in persons exposed to the action of lead during work. Report II. *Bull Inst Trop Med Gydnia* 1983; 34: 189-97.
166. Hogan GR. Neutrophilic granulocytosis following lead acetate in female mice. *Experientia* 1985; 41: 942-3.
167. Santos MA, Hall A. Influence of inorganic lead on the biochemical blood composition of the eel, *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicol Environ Saf* 1990; 20: 7-9.
168. Cadwell KC, Taiddeni L, Woodburn RL, Anderson GL, Lobell M. Induction of myeloperoxidase in granulocytes in lead intoxicated dogs. *Blood* 1979; 53: 588-93.
169. Baginski B. Einflub von blei und cadmium auf die vitalität un phagozytosefähigkeit humaner polymorphkerniger leukozyten. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig B* 1985; 181: 461-8.
170. Governa M, Valentino M, Visona I, Scielso R. Impairment of chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from lead acid battery workers. *Sci Total Environ* 1988; 71: 543-6.
171. Bergeret A, Pouget E, Tedone R, Meygret T, Cadot R, Descotes J. Neutrophil functions in lead exposed workers. *Hum Exp Toxicol* 1990; 9: 231-3.
172. Queiroz MLS, Almeida M, Gallão MI, Höher NE. Defective neutrophil function in workers occupationally exposed to lead. *Pharmacol Toxicol* 1993; 72: 73-7.
173. Guillard O, Lauwerys R. *In vitro* and *in vivo* effect of mercury, lead and cadmium of the generation of chemiluminiscence by human whole blood. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 2819-23.

174. Bingham E, Pfitzer EA, Barkley WR, Radford EP. Alveolar macrophages: reduced number in rats after prolonged inhalation of lead sesquioxide. *Science* 1968; 162: 1297-9.
175. Miszta H. Effect of lead on the stromal cells of bone marrow in rats *in vitro*. *Toxicol Ind Health* 1989; 5: 399-404.
176. Kowolenko M, Tracy L, Lawrence DA. Lead induced alterations of *in vitro* bone marrow cell responses to colony stimulating factor-1. *J Leukocyte Biol* 1989; 45: 198-206.
177. Buchmüller-Rouiller Y, Ransijn A, Mauël J. Lead inhibits oxidative metabolism of macrophages exposed to macrophage activating factor. *Biochem J* 1989; 260: 325-32.
178. Kiredmijan-Schumacher L, Stotzky G, Dickstein RA, Schwartz J. Influence of cadmium, lead, and zinc on the ability of guinea pig macrophage migration inhibitory factor. *Environ Res* 1981; 24: 106-16.
179. Koller LD, Roan JG. Effects of lead and cadmium on mouse peritoneal macrophages. *J Reticuloendothel Soc* 1977; 21: 7-12.
180. Jian Z, Ying.Han X, Hong-Fu C. The effects of lead ion on immune function of rabbit alveolar macrophages: quantification of immune phagocytosis and rosette formation by 51-Cr *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985; 78: 484-7.
181. Kowolenko M, Tracy L, Mudzinski S, Lawrence DA. Effect of lead on macrophage function. *J Leukocyte Biol* 1988; 43: 357-64.
182. Nelson DJ, Kiredmijan-Schumacher L, Stotzky G. Effect of cadmium, lead, and zinc on macrophage mediated cytotoxicity toward tumor cells. *Environ Res* 1982; 28: 154-63.

183. Mauël J, Ransijn A, Buchmüller-Rouiller Y. Lead inhibits intracellular killing of *Leishmania* parasites and extracellular cytolysis of target cells by macrophages exposed to macrophage activating factor. *J Leukoc Biol* 1989; 45: 401-9.
184. Picut CA, Lee CS, Lewis RM. Ultrastructural and phenotypic changes in Langerhans cell *in vitro* by contact allergens. *Br J Dermatol* 1987; 116: 773-84.
185. Center for Disease Control. State activities for prevention of lead poisoning among children. United States. *MMWR* 1993; 42: 165,171-2.
186. Ministerio de Trabajo y Seguridad Social. BOE 24 de abril de 1986. Orden 10125 9 abril de 1986: 14637-41.
187. Rempel D. The lead exposed worker. *JAMA* 1989; 262: 532-4.
188. Glotzer DE, Bauchner H. Management of childhood lead poisoning: a survey. *Pediatrics* 1992; 89: 614-8.
189. Ahmed AFM, Elmubarak AH. Lead and cadmium in human hair: a comparison among four countries. *Bull Environ Contam Toxicol* 1990; 45: 139-48.
190. Landrigan PhJ. Strategies for epidemiologic studies of lead in bone in occupationally exposed populations. *Environ Health Perspect* 1991; 91: 81-6.
191. Howard Hu, Milder FL, Burger DE. X-ray fluorescence measurements of lead burden in subjects with low level community lead exposure. *Arch Environ Health* 1990; 45: 335-41.
192. The American Academic of Pediatrics. Statment on childhood lead poisoning. *Pediatrics* 1987; 79: 457-64.
193. Instituto Nacional de Higiene. *Notas técnicas de prevención. Plomo. Normas para su evaluación y control* 165, 1986: 1-6.

194. Piomelli S, Rosen JF, Chisolm J, Graef JW. Management of childhood lead poisoning. *Pediatrics* 1984; 105: 523-32.
195. The Food and Drug Administration. Succimer (DMSA) approved for severe lead poisoning. *JAMA* 1991; 265: 1802.
196. Sanz-Gallén P, Nogué S, Munné P, To J. Saturnismo profesional tratado con ácido dimercaptosuccínico (DMSA). *Rev Clin Esp* 1992; 191: 58-9.
197. Off J Eur Commun. Law 105, 28 april 1977: 10.
198. Muhask P, Crocetti AF. Methods for reducing lead exposure in young children and other risk groups: an integrated suumary of a report to the US Congress on childhodd lead poisoning. *Environ Health Perspect* 1990; 89: 125-35.
199. BOE 5 diciembre 1970. Ley 25/1970, 2 diciembre 1970: 19816-29.
200. Off J Eur Commun. Law 197, 29 june 1978: 19-21.
201. Ministerio de Sanidad y Seguridad Social. Real Decreto 1995/1978, 12 de mayo 1978: 19909.
202. Off J Eur Commun. Law 358, 18 december 1986: 1-28.
203. Arroyo M, Molina MA, Martín-Serrano J, Pérez Cuadrado S. Determinación analítica de diferentes metales en células hepáticas fetales liofilizadas (SICCACELL). *Med Seg Trab* 1988; 35: 30-6.
204. Leijh PCJ, Van Furth R, Van Zwet TL. *In vitro* determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. En: Weir DM, editor. *Handbook of Experimental Immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986: 46.1-46.21.

205. Metcalf JA, Gallin JI, Naussef WM, Root RK. Preparation of cells and materials for function assays. En: Metcalf JA, Gallin Md, Naussef WM, Root RK, editores. *Laboratory Manual of neutrophil function*. New York: Raven Press, 1986: 8.
206. Herscowitz HB, Cole DE. Maintenance of macrophages *in vitro*. En: Herscowitz HB, Holden HT, Bellanti JA, Ghaffar A, editores. *Manual of macrophage methodology. Collection, characterization, and function*. New York: Marcel Dekker, 1981: 161-9.
207. Hudson L, Hay FC. Buffers and mediums. En: Hudson L, Hay FC, editores. *Practical Immunology*. Oxford London: Blackwell Scientific Publications, 1989: 472.
208. Mosier DE. Separation of macrophages on plastic and glass surfaces. *Methods Enzimol* 1984; 108: 294-7.
209. Pennline KJ. Adherence to plastic or glass surfaces. En: Herscowitz HB, Holden HT, Bellanti JA, GHaffar A, editores. *Manual of macrophage methodology. Collection, characterization, and function*. New York: Marcel Dekker, 1981: 63-73.
210. Hudson L, Hay FC. Laboratory safety, tissue culture techniques and useful data. En: Hudson L, Hay FC, editores. *Practical immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1989: 491.
211. Brummer E, McEwen JG, Stevens DA. Fungicidal activity of murine inflammatory polymorphonuclear neutrophils: comparison with murine peripheral blood PMN. *Clin Exp Immunol* 1986; 66: 681-90.
212. De la Fuente M. Changes in the macrophage function with aging. *Comp Biochem Physiol* 1985; 81 A: 935-8.

213. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1962; 115: 453-66.
214. Wilkinson PC. Locomotion and chemotaxis of leukocytes. En: Weir DM, editor. *Handbook of experimental immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986: 51.1-51.21.
215. Lohr KM, Snyderman R. *In vitro* methods for the study of macrophage chemotaxis. En: Herscowitz HB, Holden HT, Bellanti JA, Ghaffar A, editores. *Manual of macrophage methodology. Collection, characterization, and function*. New York: Marcel Dekker, 1981: 303-14.
216. Zeligs BJ. Bactericidal and fungicidal assay. En: Herscowitz HB, Holden HT, Bellanti JA, Ghaffar A, editores. *Manual of macrophage methodology. Collection, characterization, and function*. New York: Marcel Dekker, 1981: 271-9.
217. Lehrer RI, Clin MJ. Interaction of *C. albicans* with human leukocytes and serum. *J Bacteriol* 1969; 98: 996-1003.
218. Doménech JM. Comparación de dos medias. En: Doménech JM, editor. *Métodos estadísticos en ciencias de la salud*. Barcelona: Signo SA, 1990: 1-55
219. Doménech JM. Análisis de la variancia. En: Doménech JM, editor. *Métodos estadísticos en ciencias de la salud*. Barcelona: Signo SA, 1990: 1-43.
220. Doménech JM. Regresión lineal simple. En: Doménech JM, editor. *Métodos estadísticos en ciencias de la salud*. Barcelona: Signo SA, 1990: 1-35.
221. World Health Organization. *Environmental Criteria III: Lead*. World Health Organization. Geneva, 1977: 11.
222. Koller LD, Roan JG. Response of lymphocytes from lead, cadmium, and methylmercury exposed mice in the mixed lymphocyte culture. *J Environ Pathol Toxicol* 1980; 4: 393-8.

223. Talcott PA, Koller LD, Exon JH. The effect of lead and polychlorinated biphenyl exposure on rat natural killer cell cytotoxicity. *Int J Immunopharmacol* 1985; 7: 255-61.
224. Smith KL, Lawrence DA. Immunomodulation of *in vitro* antigen presentation by cations. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 96: 476-84.
225. Grant LD, Kimmel CA, West GL, Martínez-Vargas ChM, Howard JL. Chronic low level toxicity in the rat. Effects on postnatal physical and behavioral development. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 56: 42-58.
226. Kimmel CA, Grant LD, Sloan CS, Gladen BC. Chronic low level toxicity in the rat. Maternal toxicity and perinatal effects. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 56: 28-41.
227. Fowler BA, Kimmel CA, Woods JS, McCoonnell EE, Grant LD. Chronic low level toxicity in the rat. An integrated assesment of long term toxicity with special reference to the kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 56: 59-77.
228. McCarron RM, Goroff DK, Luhr JE, Murphy MA, Herscowitz HB. Methods for the collection of peritoneal and alveolar macrophages. *Methods Enzimol* 1984; 108: 275-84.
229. Wilkinson PC, Haston WS, Shields JM. Some determinants of the locomotion behaviour of phagocytes and lymphocytes *in vitro*. *Clin Exp Immun* 1982; 50: 461-73.
230. Wilkinson PC, Haston WS. Chemotaxis: an overview. *Methods Enzimol* 1988; 162: 3-16.
231. Maderazzo EG, Ward PA. Leukocyte chemotaxis. En: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, editores. *Manual of clinical laboratory immunology*. Washington: American Society for Microbiology, 1986: 290-4.

232. Wilkinson PC. Micropore filter methods for leukocyte chemotaxis. *Methods Enzimol* 1988; 162: 38-50.
233. Boumsell L, Meltzer MS. Mouse mononuclear cell chemotaxis. Differential response of monocytes and macrophages. *J Immunol* 1975; 115: 1746-8.
234. Dierich MP, Wilhemi D, Till G. Essential role of surface bound chemoattractant in leukocyte migration. *Nature* 1977; 270: 351-2.
235. Zoltán H. Chemotaxis. En: Zoltán H, editor. *The inflammatory reaction*. Amsterdam: Elsevier, 1985: 216.
236. Michna H. Induced locomotion of human and murine macrophages: a comparative analysis by means of the modified Boyden chamber system and the agarose migration assay. *Cell Tissue Res* 1989; 255: 423-9.
237. Southwick FS, Stossell TP. Phagocytosis. En: Rose NR, Friedman H, Fahey KL. *Manual of clinical laboratory immunology*. Washington: American Society for Microbiology, 1986: 326-32.
238. Sobotka TK, Brodie RE, Cook MP. Psychophysiologic effects of early exposure. *Toxicology* 1975; 5: 175-91.
239. Keller Ch A, Doherty RA. Effect of dose on lead retention and distribution in suckling and adulte female mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 52: 285-93.
240. Ma WC. Effect of soil pollution with metallic lead pellets on lead. *Arch Environ Contam Toxicol* 1989; 18: 617-22.
241. Schlick E, Friedberg KD. The influence of low lead doses on the reticulo-endothelial system and leukocytes of mice. *Arch Toxicol* 1981; 47: 197-207.
242. Warner GL, Lawrence DA. Stimulation of murine lymphocyte response by cations. *Cell Immunol* 1986; 101: 425-39.

243. Jagels MA, Hugli TE. Neutrophil chemotactic factors promote leukocytosis. *J Immunol* 1992; 148: 1119-28.
244. Zoltán H. The inflammatory exudate. En: Zoltán H, editor. *The inflammatory reaction*. Amsterdam: Elsevier, 1985: 259-72.
245. Zoltán H. Chemotaxis. En Zoltán H, editor. *The inflammatory reaction*. Amsterdam: Elsevier, 1985: 203-57.
246. Van Furth R. Phagocytic cells: development and distribution of mononuclear phagocytes in normal steady state and inflammation. En: Gallin JL, Goldstein IM, Snyderman R, editores. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press, 1988: 281-96.
247. Metcalf D, Elliot MJ, Nicola NA. The excess numbers of peritoneal macrophages in granulocyte macrophage colony stimulating factor transgenic mice are generated by local proliferation. *J Exp Med* 1992; 175: 877-84.
248. Kaminsky EJ, Fischer CA, Kennedy GL, Calandra JC. Response of pulmonary macrophages to lead. *Br J Exp Path* 1977; 58: 9-12.
249. Auger MJ, Ross JA. The biology of the macrophage. En: Lewis CE, McGee JO, editores. *The macrophage*. Oxford: Oxford University Press, 1992: 2-76.
250. Castranova V, Bowman L, Reasor MJ. Toxicity of metal ions to alveolar macrophages. *Am J Ind Med* 1980; 1: 349-57.
251. Castranova V, Bowman L, Reasor MJ, Miles PR. Effect of heavy metal ions on selected oxidative metabolic processes in rat alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 53: 14-23.
252. Gulyas H, Labedzka M, Gercken G. Depression alveolar macrophage peroxide and superoxide anion release by mineral dusts: correlation with antimony, lead, and arsenic contents. *Environ Res* 1990; 51: 218-29.

253. Labedzka M, Gulyas H, Schmidt N, Gercken G. Toxicity of metallic ions and oxides to rabbit alveolar macrophages. *Environ Res* 1989; 48: 255-74.
254. Kishimoto TK, Larson RS, Corbi AL, Dustin ML, Staunton DE, Springer TA. The leukocytes integrins. *Adv Immunol* 1989; 46: 149-75.
255. Miller LJ, Bainton DF, Borregard N, Springer TA. Stimulated mobilization of monocyte mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. *J Clin Invest* 1987; 80: 535.
256. Loose LD, Silkworth JB, Charbonneau T, Blumenstock F. Environmental chemical induced macrophage dysfunction. *Environ Health Perspect* 1981; 39: 79-91.
257. Johnson JV, Montoya IA, Olive DL. Ethiodol oil contrast medium inhibits macrophage phagocytosis and adherence by altering membrane electronegativity and microviscosity. *Fertil Steril* 1992; 58: 511-7.
258. Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, Root RK. Transduction mechanisms. En: Metcalf JA, Gallin JI, Nauseef WM, Root RK, editores. *Laboratory manual of neutrophil function*. New York: Marcel Dekker, 1986: 70.
259. Snyderman R, Pike MC. Chemoattractant receptors on phagocytic cells. *Ann Rev Immunol* 1984; 2: 257-81.
260. Lison D, Raguzzi, Lauwerys R. Comparison of the effects of auranofin, heavy metals and retinoids on protein kinase C mediated response in macrophages. *Pharmacol Toxicol* 1990; 67: 239-42.
261. Pérez JL, García JD, Pérez JL, Jiménez A. Leukocyte chemotaxis. *Allergol Immunopathol* 1988; 16: 279-83.
262. Heron DS, Shinitzky M, Herskowitz M, Samuel D. Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7463-7.

263. Röderer G, Doenges KH. Influence of trimethyl lead and inorganic lead on the *in vitro* assembly of microtubules from mammalian brain. *Neurotoxicology* 1983; 4: 171-80.
264. Speert DP. Macrophages in bacterial infection. En: Lewis CE, McGee JO, editores. *The macrophage*. Oxford: Oxford University Press, 1992: 217-63.
265. Zoltán H. Phagocytosis and release of lysosomal contents. En: Zoltán H, editor. *The inflammatory reaction*. Amsterdam: Elsevier, 1985: 273-310.
266. Loose LD, Silworth JB, Warrington D. Cadmium induced depression of the respiratory burst in mouse pulmonary alveolar macrophages, peritoneal macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 79: 326-32.
267. Sasada M, Johnston RB. Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis associates oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophages. *J Exp Med* 1980; 152: 85-98.
268. Lehrer RI. The fungicidal mechanisms of human monocytes. I. Evidence for myeloperoxidase linked and myeloperoxidase independent candidicidal mechanisms. *J Clin Invest* 1975; 55: 338-46.
269. Henson PM, Henson JE, Fittschen C, Kimani G, Bratton DL, Riches DWH. Phagocytic cells: degranulation and secretion. En: Gallin JJ, Goldstein IM, Snyderman R, editores. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press, 1988: 363-90.