

18874

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



* 5 3 0 9 5 5 9 3 0 1 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

EFECTO DEL ETANOL SOBRE LAS ALTERACIONES
INDUCIDAS EXPERIMENTALMENTE POR EL PLOMO
EN LA BIOSINTESIS DEL HEMO

Tesis doctoral presentada por Don José Luis Santos Martín
para optar al grado de doctor en Ciencias Biológicas.

Dirigida por Don Rafael Enríquez de Salamanca Lorente
Catedrático de Medicina Interna de la Universidad Complutense

Madrid, 1994

A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Doctor Don Rafael Enríquez de Salamanca por la dirección de esta Tesis Doctoral. La culminación de este trabajo y los aciertos que pudiera haber en él, se deben a sus consejos y a su calidad científica y humana.

También quiero reconocer la gran ayuda que me prestó el Doctor Don Miguel Arroyo al realizar las determinaciones de metales, así como todo el personal del Servicio de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Clínico San Carlos y en particular a su jefe Don Pablo González, que en todo momento me brindó su ayuda.

De igual manera, quiero agradecer la amabilidad y los útiles consejos que recibí del tutor de esta tesis, el doctor Don Juan Manuel García Segura.

Agradezco también el importante apoyo prestado por el Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social, bajo cuyos auspicios este trabajo ha podido ser realizado.

Guardo un gran cariño a mis compañeros de la Unidad de Porfirias que han participado en este trabajo y en especial a mi compañera y amiga Dra. María José Morán, que me enseñó casi todas las técnicas de laboratorio; a mis amigos Antonio y Paloma, que se incorporaron a la Unidad de Porfirias al mismo tiempo que yo y que pronto serán doctores, y a Maribel.

INDICE

INTRODUCCION

CAPITULO I.- PORFIRINAS Y HEMOPROTEINAS	6
CAPITULO II.- BIOSINTESIS DEL HEMO	
- Formación del ácido δ -aminolevulínico (ALA)	9
- Formación del porfobilinógeno (PBG)	11
- Formación de los Uroporfirinógenos I y III	11
- Formación de los Coproporfirinógenos I y III	14
- Formación del Protoporfirinógeno	16
- Formación de la Protoporfirina IX	17
- Formación del grupo hemo	17
CAPITULO III.- REGULACION DE LA SINTESIS DEL HEMO	
- Regulación en hígado y células no eritroides	18
- Regulación en células eritroides	21
CAPITULO IV.- TRANSTORNOS EN LA BIOSINTESIS DEL HEMO	
- Transtornos congénitos (Porfirias)	23
- Transtornos adquiridos	23
CAPITULO V.- ETANOL	
- Metabolismo	26
- Hepatotoxicidad	29
- Efecto sobre la porfirinosíntesis	32
CAPITULO VI.- PLOMO	
- Epidemiología de la intoxicación plúmbica	34
- Distribución del plomo en el organismo	36
- Toxicidad	37
CAPITULO VII.- S-ADENOSIL-L-METIONINA (SAME)	
- Características y metabolismo	44
- Reacciones de transulfuración: el glutatión (GSH)	47
- Terapéutica con SAME en las hepatopatías	50

OBJETIVO

CAPITULO VIII.- OBJETIVO	55
--------------------------------	----

MATERIAL Y METODOS

CAPITULO IX.- MATERIAL

- Animales de experimentación	57
- Vías y dosis de intoxicación	57
- Instrumental y reactivos	60

CAPITULO X.- METODOS

- Recogida de muestras	62
- Métodos analíticos	63
* Determinación de Porfirinas en orina	
* Determinación de porfirinas en hematíes	
* Determinación de Porfirinas en tejidos	
* Determinación de ALA y PBG en orina	
* Determinación de la actividad de la ALA-S	
* Determinación de la actividad de la ALA-D	
* Determinación de la actividad de la PBG-D	
* Determinación del GSH hepático	
* Determinación de metales	
- Métodos estadísticos	71

RESULTADOS

CAPITULO XI.- RESULTADOS	74
--------------------------------	----

DISCUSION

CAPITULO XII.- DISCUSION

- Concentración de plomo en sangre y tejidos	107
- Actividades enzimáticas de la ruta del hemo	112
- Contenido hepático de GSH	120
- Concentración de metales esenciales en hígado y riñón	124

- Concentración de porfirinas en sangre y tejidos	128
- Excreción de porfirinas y precursores	134
- Características generales	138
RECAPITULACION Y CONCLUSIONES	140
BIBLIOGRAFIA	143

ABREVIATURAS

ADH	alcohol deshidrogenasa
ALA	ácido delta-aminolevulínico
ALA-D	delta-aminolevulínico deshidratasa
ALA-S	delta-aminolevulínico sintetasa
ALDH	aldehído deshidrogenasa
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina trifosfato
COPRO	coproporfirina
COPRO-OX	coproporfirinógeno oxidasa
COPROgeno	coproporfirinógeno
DTT	ditiotreitól
Fe-Q	ferroquelatasa
GSH	glutati6n reducido
GSSG	glutati6n oxidado
HEMO-OX	hemo oxigenasa
HMB	hidroximetilbilano
MAT	Metionina adenosil transferasa
MEOS	Sistema microsomal de oxidaci6n del etanol
NAD	nicotinamida adenina dinucle6tido
NADP	nicotinamida adenina dinucle6tido fosfato
PBG	porfobilin6geno
PBG-D	porfobilin6geno desaminasa
PCT	porfiria cutánea tarda
PEL	protoporfirina eritrocitaria libre
PPE	protoporfirina eritrocitaria total
PROTO	protoporfirina
PROTO-OX	protoporfirin6geno oxidasa
PROTOgeno	protoporfirin6geno
SAMe	S-Adenosil-L-Metionina
URO	uroporfirina
URO-D	uroporfirin6geno descarboxilasa
UROgeno	uroporfirin6geno
ZPP	zinc-protoporfirina

INTRODUCCION

CAPITULO I.- PORFIRINAS Y HEMOPROTEINAS

Las estructuras de tipo tetrapirrólico (porfirinas y derivados) unidas a un núcleo metálico, se encuentran ampliamente distribuidas en la biosfera (Smith 1975). En mamíferos, las porfirinas incluyen un átomo de hierro y constituyen una importante unidad funcional llamada grupo hemo (Figura 1).

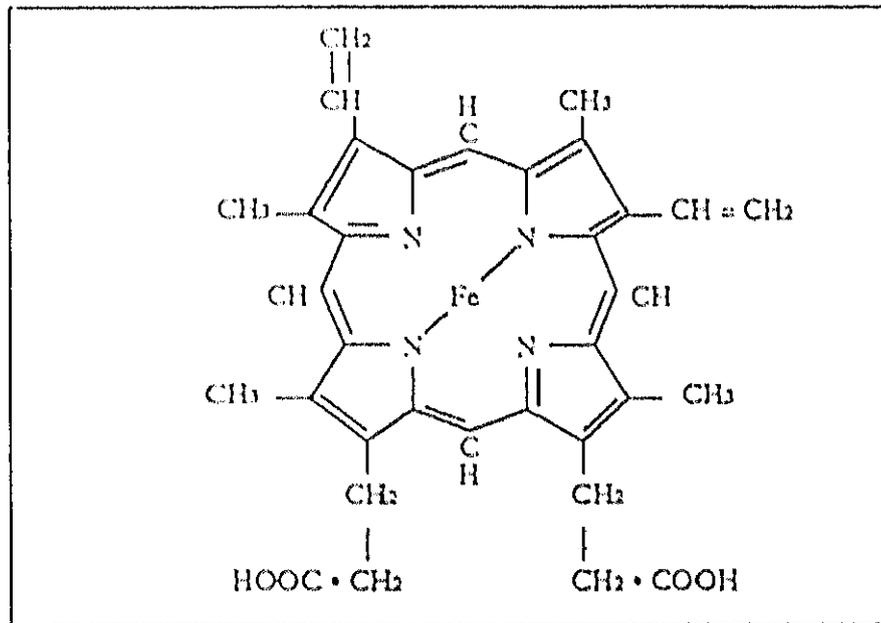


Figura 1.- Hemo (Ferroprotoporfirina IX)

Existen numerosas proteínas que contienen hemo como grupo prostético. Todas las células de mamíferos producen el suficiente hemo necesario para satisfacer la producción de hemoproteínas involucradas en la respiración celular (citocromos). Además, existen ciertos tejidos como el eritroide, hígado y riñón, que producen una mayor cantidad de hemo que desempeña funciones específicas vitales en el metabolismo de mamíferos (Bottomley y Muller-Eberhard 1988). Las funciones más importantes de las hemoproteínas se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1.- PRINCIPALES HEMOPROTEINAS Y SU FUNCION BIOLÓGICA.

Hemoproteína	Reacción química	Función biológica
Hemoglobina Mioglobina	Unión reversible con el oxígeno	Transporte de oxígeno a los tejidos
Citocromos (b, c1, c, a y a3)	Transporte de electrones	Cadena respiratoria
Citocromo P-450	Monooxigenación	Destoxificación
Catalasas Peroxidasas	Reacciones con peróxidos	Conversión de peróxidos en agua
Triptófano pirrolasa	Oxidación del triptófano	Regulación de la síntesis del hemo

Las porfirinas son compuestos provenientes de oxidación de los porfirinógenos (Figura 2). Estos últimos son los intermediarios naturales de la síntesis del hemo y no las porfirinas, excepción hecha de la protoporfirina IX, que actúa como sustrato en el último paso de la porfirinosíntesis. Las porfirinas, al contrario que los porfirinógenos, poseen dobles enlaces conjugados y muestran intensa fluorescencia al ser irradiadas con luz ultravioleta en la llamada "banda de Soret" (400-410 nm, (Bloomer y Straka 1988).

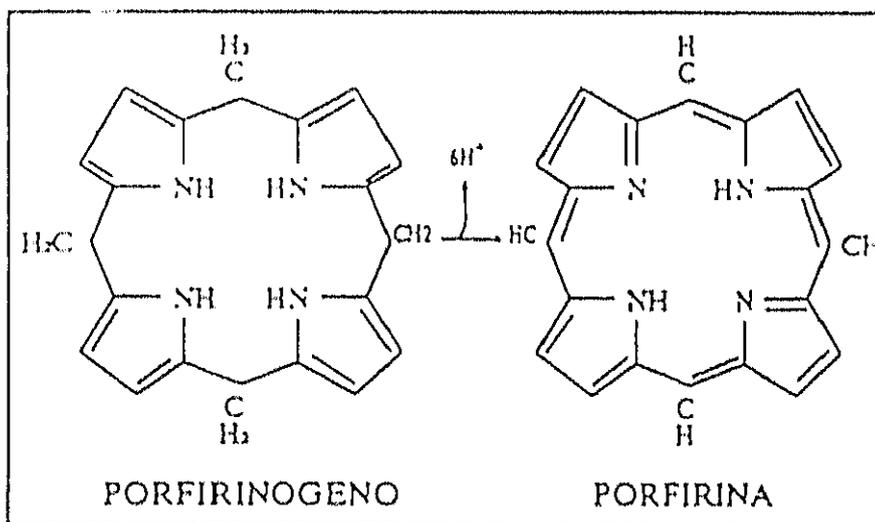


Figura 2.- Estructura del porfirinógeno y de la porfirina

Todas las porfirinas tienen la misma estructura básica compuesta por cuatro anillos pirrólicos (A, B, C, D) unidos por enlaces metilénicos. Las distintas porfirinas se diferencian en la composición de las cadenas laterales unidas al anillo aromático central (Battersby y McDonald 1975). El grado de hidrosolubilidad depende del número de grupos carboxilo presentes en sus cadenas laterales.

CAPITULO II.- BIOSINTESIS DEL HEMO

La ruta metabólica de la biosíntesis del hemo aparece esquematizada en la Figura 3.

Formación del ácido δ -aminolevulínico (ALA)

La porfirinosíntesis comienza en la mitocondria con la condensación y posterior descarboxilación de una molécula de succinil-CoA procedente del ciclo de los ácidos tricarbónicos y el aminoácido glicina (Bickers 1986) mediante la enzima δ -aminolevulínico sintetasa (EC. 2.3.1.37) (ALA-S) que requiere la presencia del cofactor piridoxal 5 fosfato, derivado de la vitamina B₆ (Kappas y cols. 1989).

Los análisis en diferentes tejidos de la rata, confirman la existencia de dos genes distintos para el ALA-S: uno que se expresa sólo en eritrocitos y localizado en el cromosoma X (Cox y cols. 1990) y otro de distribución ubicua localizado en el cromosoma 3 (Sutherland y cols. 1988).

El ALA-S se sintetiza en el citoplasma. En hígado, la secuencia del ARNm codifica un precursor de 635 aminoácidos (Borthwick y cols. 1985), que se asocia a otras proteínas para formar un agregado que será translocado a la mitocondria. En este proceso, la enzima pierde un fragmento de 56 aminoácidos, paso necesario para adquirir su definitiva capacidad catalítica en la matriz mitocondrial (Grandchamp y Nordmann 1988).

El hemo controla la síntesis, transporte y actividad del ALA-S por un mecanismo feedback negativo, constituyendo esta enzima la llave de la regulación de la síntesis del hemo (Battle 1986) evitando así la innecesaria acumulación de intermediarios en la ruta.

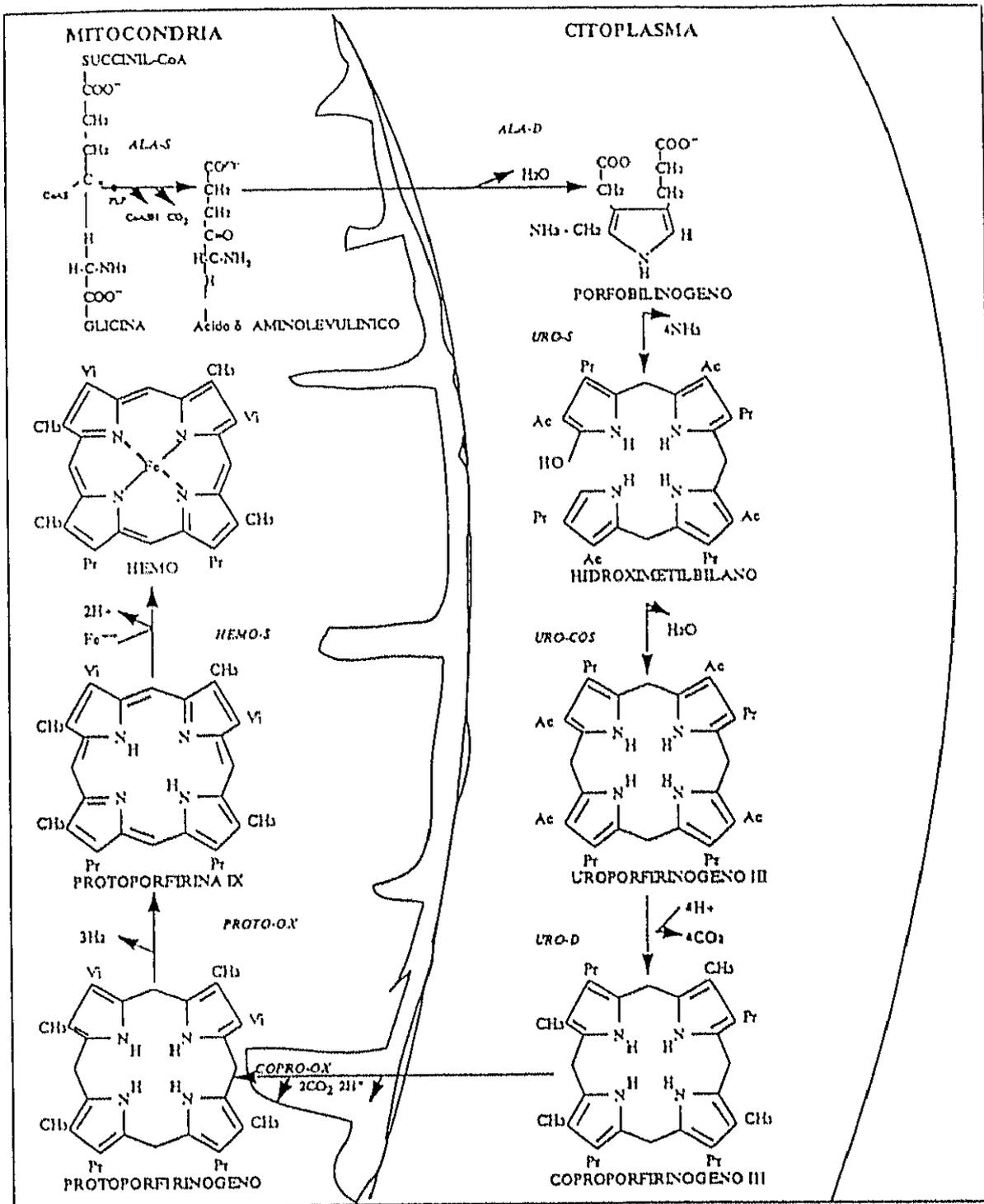


Figura 3.- Esquema de la ruta biosintética del hemo

(Tomada de Bottomley y cols)

La actividad de la enzima se ha visto inducida por la acción de numerosas drogas (Granick 1966). Esta inducción es bloqueada por la presencia de carbohidratos (Cánepa y cols. 1985), fenómeno ya observado en otras enzimas y denominado "efecto glucosa".

Formación del porfobilinógeno (PBG)

La formación del monopirrol PBG se realiza a través de la enzima citosólica δ -aminolevulínico deshidratasa (EC 4.2.1.24) (ALA-D) por la asimétrica condensación de dos moléculas de ALA y con la eliminación de dos moléculas de agua. Es una enzima homooctomérica dependiente de zinc (Gibbs y Jordan 1981; Dent y cols. 1990).

Es una enzima muy sensible a la acción de diversos xenobióticos, y por ello, ha sido ampliamente estudiada en toxicología. Es bien conocida la acción inhibitoria que sobre ella ejerce el etanol (McColl y cols. 1981) y los agentes bloqueantes de los grupos sulfidrílicos como son los metales pesados, que inhiben la actividad de la enzima en concentraciones muy bajas (Moore 1986). Los agentes quelantes como el EDTA, inactivan rápidamente la enzima por su acción secuestrante sobre el zinc (Mitchell y cols. 1977).

El gen que codifica el ALA-D en humanos se ha localizado en la banda 9q34 del cromosoma 9 (Potluri y cols. 1987). Se ha postulado la existencia de dos isoenzimas del ALA-D que serían expresión de dos alelos comunes. Estas dos isoenzimas han sido separadas (Battistuzzi y cols. 1981), y no presentan diferencias en su capacidad catalítica en eritrocitos humanos.

Formación de los Uroporfirinógenos I y III

La condensación y posterior ciclación de cuatro moléculas de porfobilinógeno para formar uroporfirinógeno III se realiza mediante la acción coordinada de dos enzimas: la Porfobilinógeno Desaminasa (EC 4.3.1.8) (PBG-D), también llamada

Hidroximetilbilano sintetasa, y la Uroporfirinógeno III cosintetasa (EC 4.2.1.75) (URO-CoS) (Figura 4).

La PBG-D es una enzima citosólica que cataliza la polimerización cabeza-cola de cuatro moléculas de PBG (Jordan y Berry. 1980) para formar un tetrapirrol octocarboxílico inestable llamado hidroximetilbilano (HMB) que constituye a su vez el sustrato de la URO-CoS, que cierra el anillo tetrapirrólico en la forma isomérica III. Inicialmente se pensó que estas dos enzimas actuaban en un complejo único, pero se ha comprobado que actúan secuencial e independientemente (Jordan y cols. 1986).

Se ha observado una ciclación no enzimática del HMB que origina el isómero I del uroporfirinógeno (Burton y cols. 1979). Este isómero no tiene significación biológica, aunque puede ser metabolizado posteriormente, dando lugar a la serie isomérica de porfirinógenos I, que constituyen una "vía muerta" metabólica.

Los ocho grupos carboxílicos del UROgeno le confieren gran hidrosolubilidad por lo que se excreta casi exclusivamente por la orina (Enríquez de Salamanca y cols. 1982)

Las formas eritroide y no eritroide de la PBG-D difieren en un péptido de 17 aminoácidos, situado en el extremo N-terminal (Grandchamp y cols. 1987). Estas formas molecularmente distintas provienen de un único gen que ha sido caracterizado en el cromosoma 11 en humanos (Chretien y cols. 1988). La localización y secuenciación del gen de la URO-CoS en el cromosoma 10, ha sido realizado por Astrin y cols. (1991).

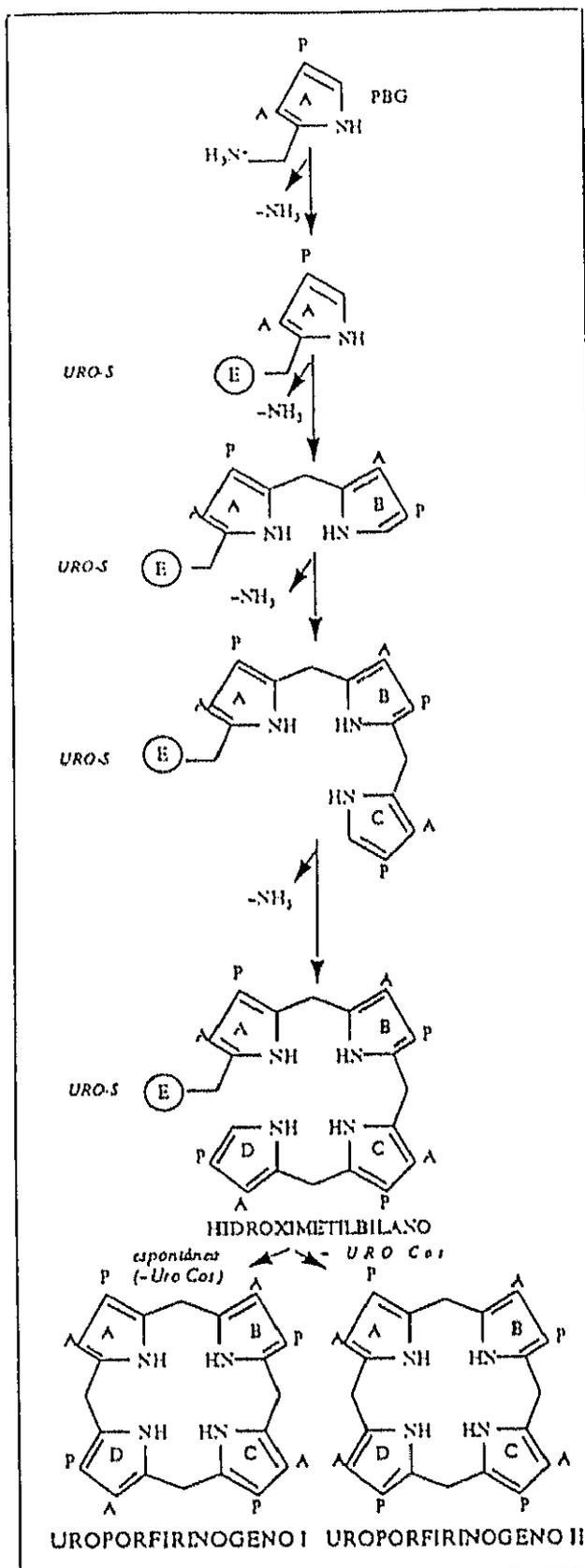


Figura 4.- Formación de Uroporfirínógeno I y III desde porfobilinógeno

Formación de los Coproporfirinógenos I y III

La última enzima citosólica de la ruta, la Uroporfirinógeno descarboxilasa (EC 4.1.1.37) (URO-D), descarboxila sucesivamente las cuatro cadenas laterales de ácido acético de los UROgenos I y III convirtiéndolos en Coproporfirinógenos I y III (COPROgenos I y III). Los isómeros de la serie III (activos biológicamente), se descarboxilan más rápidamente que los biológicamente inactivos isómeros de la serie I (Figura 5).

Es una enzima termosensible y anaeróbica que es inhibida por el oxígeno molecular. Presenta grupos sulfidrílicos en su centro activo (De Verneuil y cols. 1983).

En este proceso se forman hepta-, hexa-, penta-, y finalmente tetracarboxil porfirinógenos. El primer paso descarboxilativo es el más rápido (Smith y Fancis 1981) y el producto final de la enzima es un porfirinógeno tetracarboxílico, el COPROgeno.

Existe una ruta alternativa en el metabolismo del UROgeno III que es la llamada ruta de las isocopropofirinas (Elder 1982). En esta ruta, el Pentageno III formado según hemos descrito, podría actuar como sustrato de la siguiente enzima de la ruta biosintética del hemo, la Coproporfirinógeno oxidasa (COPRO-OX), para formar Dehidroisocoproporfirinógeno. Este porfirinógeno podría ser metabolizado nuevamente por la URO-D formando Harderoporfirinógeno, con tres grupos carboxílicos. Finalmente, la COPRO-OX mitocondrial, mediante una descarboxilación oxidativa, lo transformaría en Protoporfirinógeno (PROTOgeno).

Esta ruta no parece tener misión fisiológica, pero adquiere gran relevancia en los casos de déficit congénito de la URO-D, como es en la Porfiria Cutánea Tarda (PCT). En esta enfermedad, el daño celular ocasionado, permitiría el tránsito bidireccional

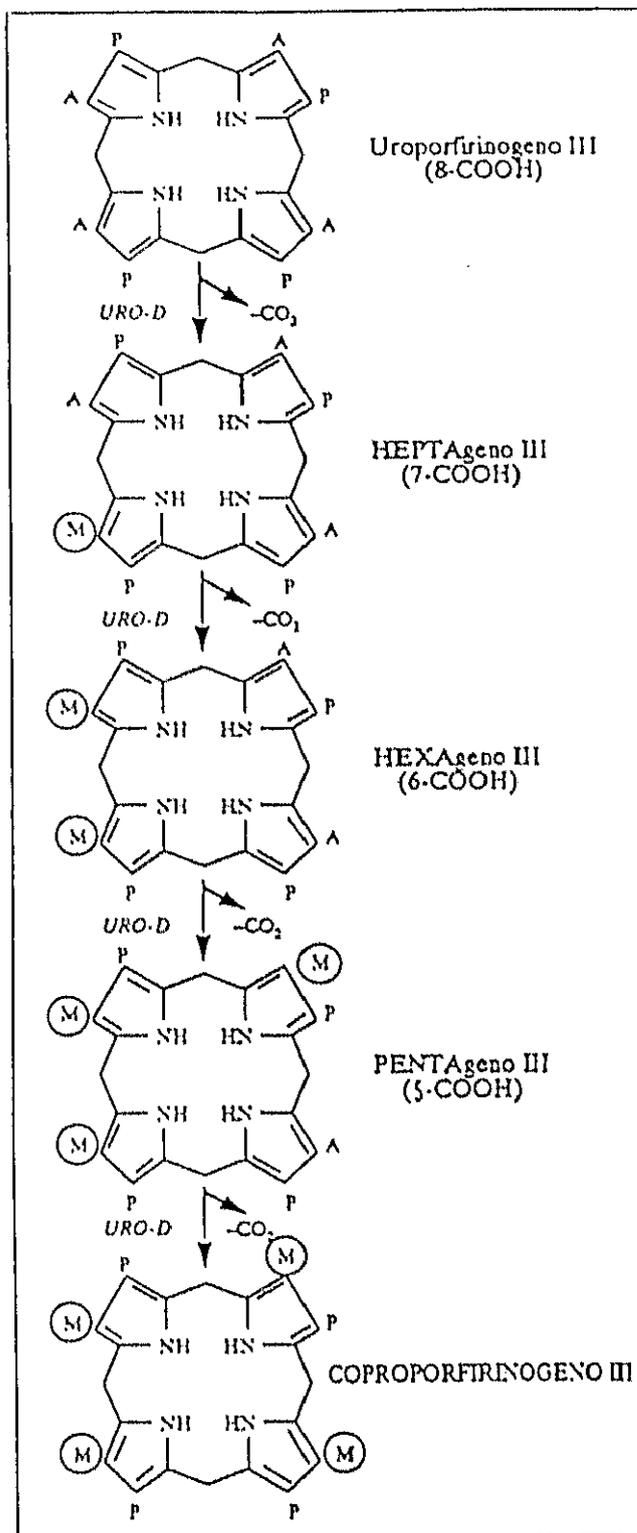


Figura 5.- Formación del coproporfirínógeno desde Uroporfirínógeno de la línea isomérica III.

de los sustratos a través de la membrana mitocondrial. La existencia de Isocopoporfirinas en heces, es característica propia de la PCT y de su modelo experimental (Elder 1971).

El ARNm que codifica el URO-D parece ser idéntico en todas las estirpes celulares en humanos, y situado en la banda 1p34 del brazo corto del cromosoma 1 (Romeo y cols. 1986). Recientemente se ha propuesto la existencia en pacientes con PCT, de una isoforma hepática de la URO-D distinta a la que se expresa en eritrocitos o linfoblastos (Mukerji y Pimstone 1993), aunque tal hipótesis no es mayoritariamente admitida.

Formación del Protoporfirinógeno

La Coproporfirinógeno oxidasa (EC 1.3.3.3.) cataliza la descarboxilación y oxidación de dos cadenas propiónicas de los anillos A y B del COPROgenio III. La reacción se produce en presencia de oxígeno y se liberan en total dos moléculas de CO₂ y 2 protones (Batlle y cols. 1965; Bogard y cols. 1989).

En una primera descarboxilación oxidativa, se forma un porfirinógeno tricarboxílico, el HARDERogenio, que posteriormente sufre una nueva descarboxilación para rendir Protoporfirinógeno (PROTOgenio) (Yoshinaga y Sano 1980)

Los dos grupos carboxílicos del PROTOgenio le confieren poca solubilidad en agua, por lo que es excretado exclusivamente por vía bilio-fecal (Moore y Disler 1985).

Esta enzima se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria, débilmente unida a la membrana interna (Elder y Evans 1978). Es altamente específica por el COPROgenio III, sin permitir la metabolización del isómero de tipo I.

El gen que codifica la COPRO-OX humana ha sido localizado en el cromosoma 9 (Grandchamp y cols. 1983).

Formación de la Protoporfirina IX

El PROTOgenio atraviesa la membrana interna mitocondrial para ser sustrato de la siguiente enzima de la ruta (Poulson 1976): la Protoporfirinógeno oxidasa (PROTO-OX) (EC 1.3.3.4).

La PROTO-OX se encuentra unida a la membrana interna mitocondrial (Ferreira y cols. 1988). Requiere la presencia de oxígeno molecular como aceptor primario de electrones (Siepker y cols. 1987). En la oxidación, se liberan 6 átomos de hidrógeno.

Formación del grupo Hemo

La ferroquelatasa o Hemo Sintetasa (Fe-Q) (EC 4.99.1.1), inserta un átomo de hierro en la molécula de Protoporfirina IX. Fe-Q es una lipoproteína que se asienta en la membrana interna mitocondrial y orientada hacia la matriz (Daily 1984).

Fe-Q se une en primer lugar al ión hierro férrico y lo reduce a ión ferroso, para posteriormente insertarlo en la protoporfirina y formar el grupo hemo. Es una enzima muy poco específica que puede utilizar otras porfirinas (mesoporfirinas, deuteroporfirinas) como sustrato, así como otros metales divalentes distintos del hierro como cobalto o zinc.

La estructura del gen de la ferroquelatasa y su localización en el cromosoma 18 ha sido determinada por Taketani y cols. (1992).

CAPITULO III.- REGULACION DE LA SINTESIS DEL HEMO

Regulación en hígado y células no eritroides

La secuencia de reacciones enzimáticas en la síntesis del hemo conllevan una pequeña acumulación y pérdida de los respectivos sustratos. Esta pérdida está estimada en menos del 2.5% del ALA utilizado al comienzo de la porfirinosíntesis (Elder 1982). Existen dos enzimas que tienen mucha menor actividad catalítica relativa que el resto de las enzimas de la ruta, que son la ALA-S y la PBG-D. La primera de ellas es la enzima clave en la regulación de la ruta, y la PBG-D es considerada como segunda enzima limitante de la síntesis del hemo (Brodie y cols. 1977).

Es generalmente aceptado que los niveles intracelulares de hemo son los responsables del control de la biosíntesis del hemo a través de su acción sobre la síntesis y transporte de la ALA-S (De Matteis 1971; Muller-Eberhard y Vincent 1985).

Las concentraciones de hemo intracelular en condiciones normales, mantienen inhibida la transcripción del ALA-S (Srivastava y cols. 1980). Sin embargo, se ha observado un importante incremento en la cantidad de este ARNm en el hígado tras la administración de ciertas drogas (Srivastava y cols. 1988). La regulación de la tasas de ALA-S a través del control de su síntesis, es posible gracias a que esta enzima tiene una corta vida media en el hepatocito (aproximadamente 70 minutos) (Tschudy y cols. 1965).

Un posible sistema de control para la ALA-S hepática aparece ilustrado en la figura 6. Este modelo se basa en la existencia de un *pool* de hemo citoplásmico y otro nuclear en permanente equilibrio. La transcripción del gen de la ALA-S estaría reprimida por un complejo "hemo-proteína represora" que interferiría en la unión del promotor con el factor de transcripción. Cuando las tasas de hemo son bajas, esta represión

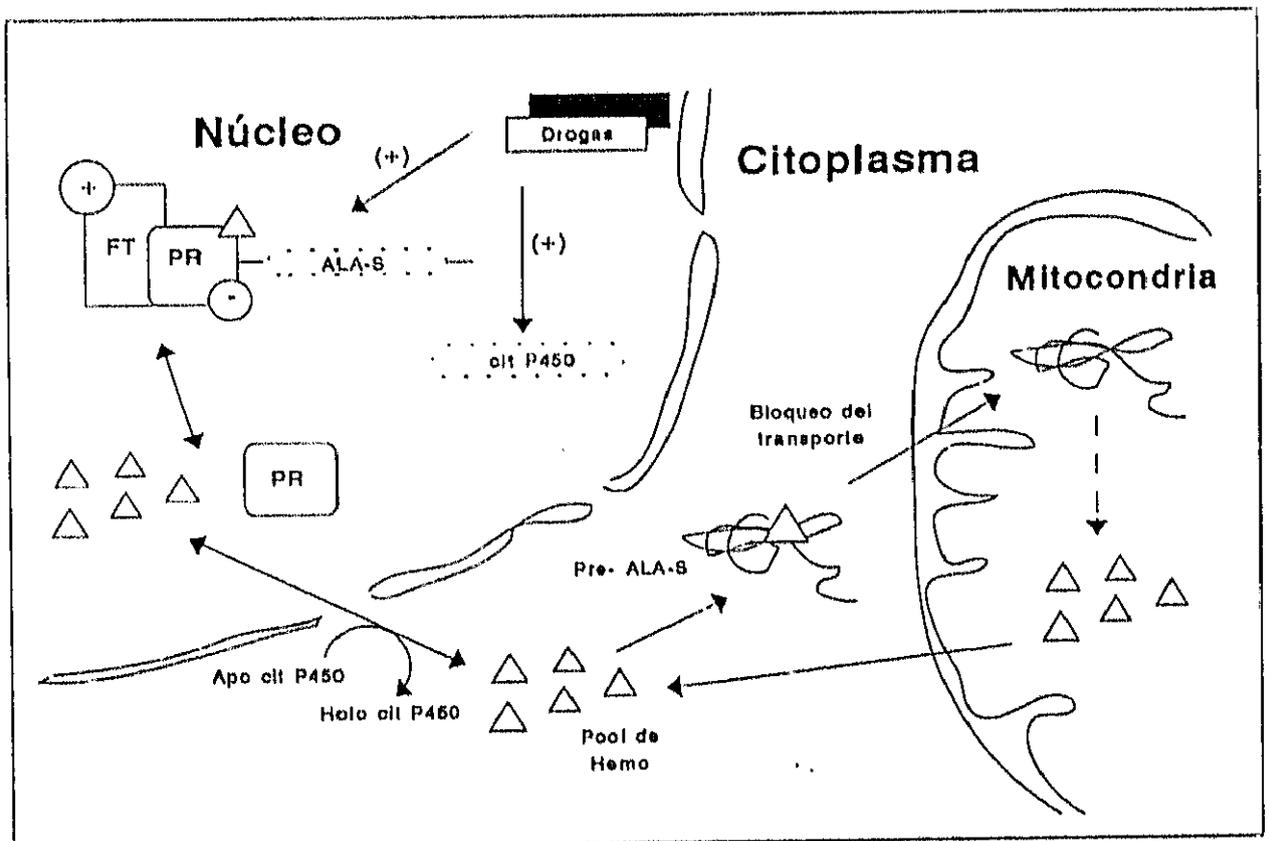
se desbloquea. May y cols. (1990) indican que las drogas activadoras de la transcripción de la ALA-S podrían actuar directamente sobre este gen y también sobre el gen del citocromo P450. De esta forma, la captación de hemo del apocitocromo P450 para transformarse en su forma activa, el holocitocromo P450, reduciría los niveles del *pool* de hemo.

También se ha comprobado que inhibe la síntesis de la enzima en la elongación de la cadena peptídica (Yamamoto y cols. 1982). Un segundo camino a través del cual el pool de hemo controla la síntesis de ALA se manifiesta en su influencia en el transporte de la ALA-S a la mitocondria. Este proceso es inhibido por la administración de hemo (Yamamoto y cols. 1981).

Figura 6.- Control de la biosíntesis del hemo en hígado

PR:proteína represora; FT:factor de transcripción

Tomado de May y cols.



El hemo no parece inhibir directamente la actividad de la ALA-S tanto en la enzima purificada (Pirola y cols. 1984), como en la mitocondria intacta (Wolfson y cols. 1979).

La concentración citosólica del *pool* de hemo libre se ha estimado en 0.05-0.1 μM . Esta magnitud se ha evaluado calculando la concentración de las hemoproteínas más abundantes como el citocromo P-450, la catalasa o el citocromo b_5 . Una estimación más fina de este *pool* se puede hacer a través de la valoración de la actividad de la triptófano pirrolasa (EC 1.13.11.11), primera enzima del catabolismo del triptófano. Esta hemoproteína, a diferencia de las otras mencionadas, tiene una corta vida media y una baja afinidad con el hemo (Badawy y cols. 1986).

En la regulación del mantenimiento y degradación del *pool* de hemo, la enzima Hemo Oxigenasa (HEMO-OX) (EC 1.14.99.3) juega un papel importante, como primera enzima del catabolismo del hemo. En esta enzima, el hemo actúa como cofactor y como sustrato (Kikuchi y Yoshida 1983). Se ha comprobado que una acumulación de hemo secundaria al uso de un inhibidor de la HEMO-OX, la Sn-protoporfirina, suprime la inducción de la ALA-S en la porfiria experimental (Galbraith y cols. 1985).

Debido a la distinta localización de las hemoproteínas en la célula, Bonkowsky y cols. (1980) propusieron un modelo complejo de compartimentalización del *pool* de hemo. Según esta hipótesis, el *pool* mitocondrial regularía la síntesis de la citocromo oxidasa. El *pool* citosólico reprimiría la síntesis y el transporte de la ALA-S y controlaría la actividad de la HEMO-OX y de la triptófano pirrolasa. Finalmente, el *pool* microsomal regularía la actividad del sistema microsomal de la HEMO-OX. En este sentido, Dwarki y cols. (1987) han comprobado una repuesta diferencial entre el *pool* citosólico, microsomal y nuclear frente a la acción tóxica de distintos xenobióticos.

Regulación en células eritroides

La regulación de la síntesis en eritrocitos, donde se producen las mayores cantidades de hemo, no está tan bien definida como en células hepáticas. Las diferencias entre ambos tejidos se pusieron de manifiesto al intentar reproducir en eritrocitos los estudios previamente llevados a cabo en hígado (Sassa 1980). El tejido sanguíneo está sujeto a procesos de diferenciación y proliferación mediados por la acción de la eritropoyetina y por los procesos de maduración que acontecen en los eritroblastos (Bottomley y Muller-Ebenhard 1988). Cox y cols. (1990) diferenciaron físicamente el gen de la ALA-S hepática y eritroide, existiendo una distinta regulación de la transcripción (May y cols. 1990).

Al contrario que en hígado, la transcripción del gen de la ALA-S no parece estar afectada por los niveles del producto final de la ruta. Tampoco se ha podido demostrar que el hemo interfiera en el transporte del ARNm de la ALA-S (Elferink y cols. 1988). Se ha sugerido la hipótesis (Ponka y Schulman 1986) de que las enzimas de la porfirinosíntesis se encuentren totalmente expresadas en las células eritroides y no así en los hepatocitos. Estos mismos autores, indican también que el aporte de hierro por parte de la transferrina es el factor regulador de la porfirinosíntesis en el tejido eritroide, activando la síntesis de ALA-S en el proceso translacional. El hemo podría actuar regulando la liberación de hierro por parte de la transferrina (May y Bawden 1989). Un esquema de la regulación de la ALA-S en eritrocitos aparece en la figura 7.

La acción de la eritropoyetina en células de médula ósea de mamíferos induce un aumento en la síntesis de hemo (Krantz y cols. 1963). En los estudios de Beru y Goldwasser (1985), la actividad de la PBG-D se incrementa 3,5 veces en respuesta a la acción de la eritropoyetina, mientras que la actividad de la ALA-S, ALA-D o Fe-Q permanecen inalteradas, por lo que la PBG-D parecía ser la enzima reguladora de la producción de hemo en esta

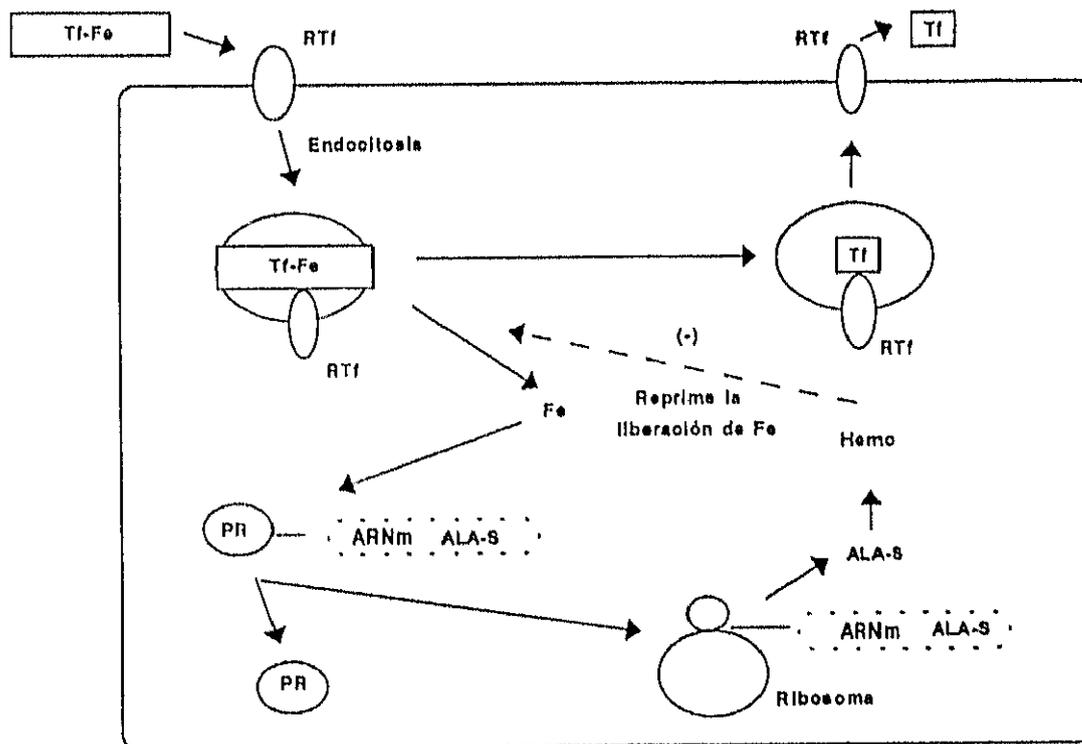
situación. Por el contrario, Houston y cols. (1993) han resaltado la importancia de la Fe-Q como enzima limitante de la ruta durante la eritropoyesis. En otro estudio, Abraham y cols. (1989) demostraban el incremento de la actividad de la ALA-S y la PBG-D como respuesta biológica a la eritropoyetina.

Recientemente se ha propuesto (Labbe y Carlson 1993) que la Zn-Protoporfirina (ZPP) podría formar parte del pool de hemo regulador por su acción inhibitoria sobre la HEMO-OX. La existencia de esta metaloenzima limitaría el catabolismo del hemo en estados de deficiencias de hierro. Se han encontrado mayores concentraciones de ZPP en neonatos que en adultos, lo cual podría suponer una protección contra la toxicidad de la bilirrubina, último producto del catabolismo del hemo.

Figura 7.- Control de la biosíntesis del hemo en eritrocitos

Tf:transferrina; RTf:receptor de transferrina;PR:proteína represora

Tomado de May y cols.



CAPITULO IV.- TRANSTORNOS DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO

Pueden ser de dos tipos: congénitos y adquiridos.

Transtornos congénitos (Porfirias)

Las porfirias son errores congénitos del metabolismo de las porfirinas originados por la hipoactividad de una de las enzimas que intervienen en la ruta biosintética del hemo (Enríquez de Salamanca 1985). Las distintas variedades de porfiria en relación con el defecto enzimático que originan, aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2.- Clasificación de las porfirias

<u>Variedad de Porfiria</u>	<u>Enzima inhibida</u>
Aguda de Doss	ALA-D
Aguda intermitente	PBG-D
congénita de Günther	URO-CoS
Cutánea tarda	URO-D
Coproporfiria	COPRO-OX
Variegata	PROTO-OX
Protoporfiria	Fe-Q

Transtornos adquiridos

Antes de abordar este apartado, debe tenerse en cuenta que la síntesis de porfirinas en sujetos normales no es un proceso estático sino sujeto a variaciones, como se observó en las fluctuaciones de la síntesis del hemo durante el ciclo menstrual (McColl y cols. 1982). Se ha comprobado que la edad tiene un efecto pronunciado sobre esta ruta metabólica (Freedman 1987).

Existen una gran variedad de circunstancias (Tabla 3) que desembocan en una sobreproducción de porfirinas y su consiguiente aparición en cantidades incrementadas en orina (Enríquez de

Salamanca 1988). Es importante subrayar el papel de la colestasis, asociada o no a hepatopatía crónica, que disminuye la eliminación biliar de Coproporfirina y la aumenta en orina (De Rover y cols. 1984; Guerra y cols. 1985).

Tabla 3.- CIRCUNSTANCIAS ASOCIADAS A SOBREPRODUCCION DE PORFIRINAS O DE SUS PRECURSORES

- * Enfermedades hematológicas: anemias, leucemias y linfomas.
- * Enfermedades hepatobiliares: hepatitis crónica e infecciosa, hepatopatía etílica, colestasis, insuficiencia renal crónica
- * Intoxicaciones: policlorinados, metales pesados, analgésicos, hipnóticos, alcohol.
- * Enfermedades metabólicas: diabetes mellitus, tirosinemia hereditaria.
- * Otras: embarazo, ayuno, mononucleosis etc...

Se han estudiado los efectos que numerosos metales ejercen sobre la porfirinosíntesis (Tephly y cols. 1977). No existe un mecanismo tóxico común para ellos, ni siquiera para un mismo metal, ya que puede depender de la forma química en que se encuentre (Kappas y Drummond 1984). Se ha comprobado que el aluminio y selenio aumentan la actividad de la ALA-S (Maines y Kappas 1976). La administración oral de sulfato de zinc a sujetos normales incrementó la actividad de la ALA-D en los estudios de Abdulla y Svensson (1979). Sin embargo, Meredith y Moore (1980) y Guerra (1990) observaron este efecto pero en magnitudes muy pequeñas y con escasa significación. Se observó también, que el cadmio en bajas concentraciones, activa a la ALA-D eritrocitaria

(Davis y Avram 1978) y la deprime a altas concentraciones.

Se comprobó que ciertos metales pesados inducen la actividad de la hemooxigenasa y reducen la concentración de citocromo P-450 en animales y cultivos celulares (Eaton y cols. 1980). Los transtornos ocasionados por el alcohol y el plomo sobre la síntesis del hemo (Moore 1991) serán estudiados en los próximos capítulos de esta introducción.

CAPITULO V.- ETANOL

Metabolismo

El etanol es una sustancia polar, miscible en cualquier proporción con el agua y que, por su pequeño tamaño, atraviesa las membranas celulares por simple difusión (Geokas y cols. 1981).

El etanol, una vez absorbido, llega al hígado por vía portal, donde es degradado por oxidación en un 90% gracias a los sistemas enzimáticos que este órgano dispone para tal fin. Existen tres vías metabólicas fundamentales en el hígado para la oxidación del etanol (Lieber 1985) (Figura 8):

- 1.- Vía de la ALCOHOL-DESHIDROGENASA (ADH), ubicada en el citosol.
- 2.- Vía del SISTEMA MICROSOMAL DE OXIDACION DEL ETANOL (MEOS) localizada en el retículo endoplásmico.
- 3.- Vía de la CATALASA, situada en los peroxisomas.

1.- La vía de la ADH constituye la principal ruta metabólica hepática para la oxidación del etanol (Bosron y Li 1987). El hidrógeno en esta reacción, es transferido al cofactor NAD que queda reducido. La ADH tiene una K_m muy baja para el etanol (0.2 a 2 mmol), por lo que este sistema funciona a bajas concentraciones del tóxico. La reacción enzimática queda esquematizada como sigue:



2.- Lane y Lieber (1966) observaron una proliferación de membranas microsomales hepáticas asociadas a un consumo prolongado de etanol, y sugirieron la posibilidad de que existiera un sistema de oxidación inducible del etanol. Este

sistema, dependiente de citocromo P-450, es conocido como MEOS ("Microsomal ethanol oxidizing system") y es el segundo compartimento del hepatocito capaz de oxidar el etanol.

El MEOS transforma el alcohol en acetaldehído mediante un sistema dependiente de NADPH, según la siguiente reacción:

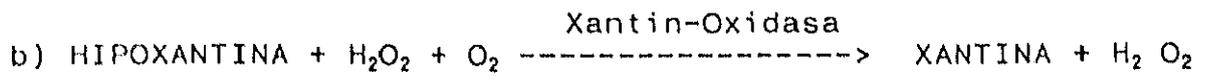


El MEOS tiene una K_m relativamente alta para el etanol (8 a 10 mmol) comparada con la de la ADH. Así, la ADH es la responsable de la oxidación de la mayor parte del etanol cuando éste se presenta en niveles bajos, pero no necesariamente a altas tasas del tóxico o durante la ingesta prolongada de etanol, dada la inducibilidad del MEOS (Lieber 1988a).

Ohnisi y Lieber (1977) demostraron la inducción de un solo P-450 tras la administración prolongada de etanol. Posteriormente, Nebert y cols. (1991) llamaron P-4502E1 a este citocromo inducible. Recientes estudios han confirmado que la zona perivenular del lóbulo hepático es la primera en mostrar los signos de la toxicidad del alcohol, precisamente donde la inducción del MEOS es máxima (Tsutsumi y cols. 1989) y donde el contenido celular de glutatión, tripéptido involucrado en procesos de defensa celular, es menor (Smith y cols. 1979).

3.- El sistema peroxisomal de las catalasas tiene la capacidad *in vitro* de oxidar el alcohol etílico en presencia de un sistema generador de agua oxigenada (H_2O_2), según las reacciones:





En la reacción a) el sistema NADPH-oxidasa genera la suficiente cantidad de H₂O₂ para que por la actividad de la catalasa sea oxidado el etanol y convertido en acetaldehído. En la reacción b), la formación de H₂O₂ se debe a la actividad de la enzima xantin-oxidasa.

La importancia de este tercer sistema en animales es aún objeto de debate (Abbodanza y cols. 1989), mientras que se desconoce el papel que tiene en los humanos (Lieber 1990).

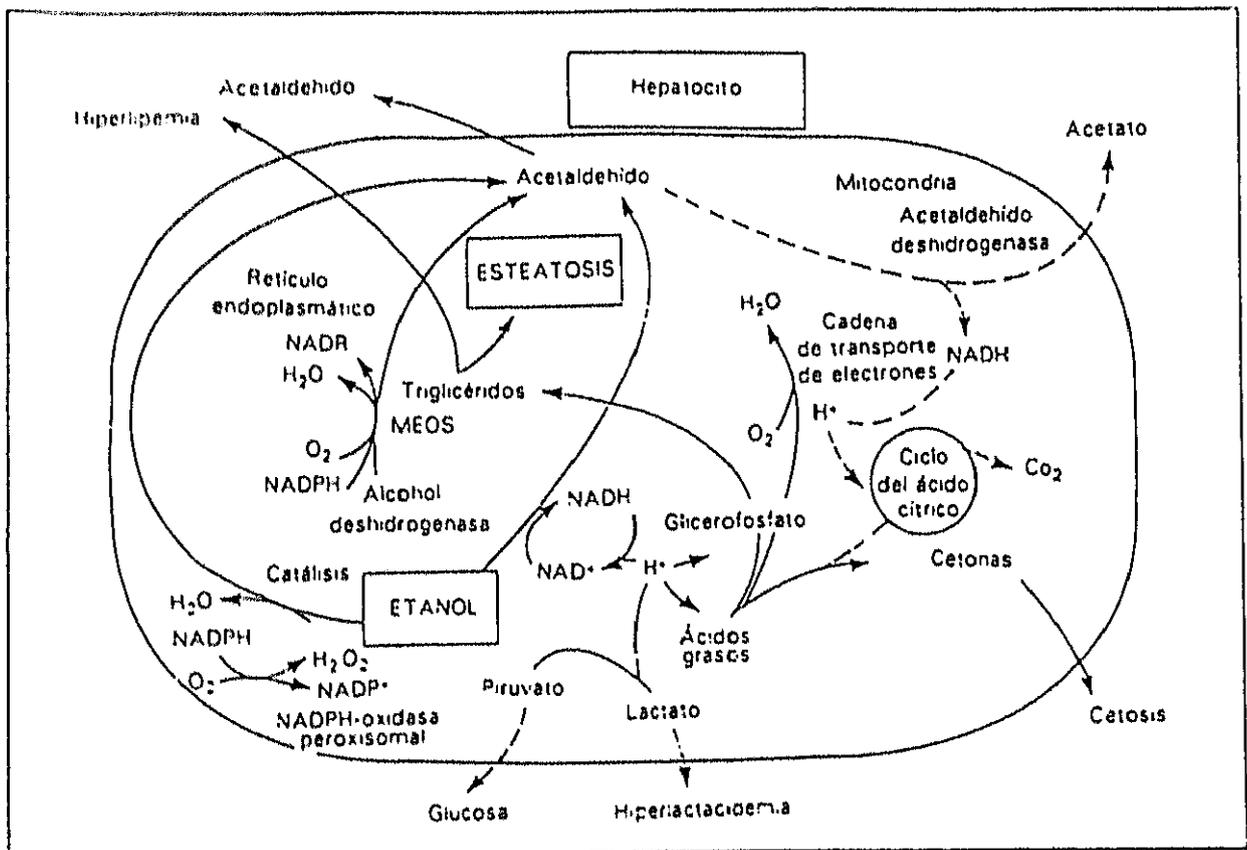
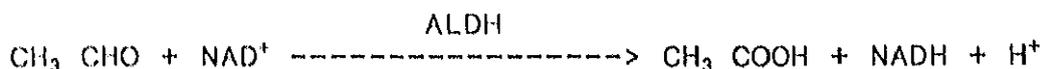


Figura 8.- Metabolismo del etanol en el hígado
Tomado de Lieber

El acetaldehído, compuesto derivado de la oxidación del etanol, es metabolizado por el sistema enzimático de la aldehído deshidrogenasa (ALDH), enzima NAD-dependiente para rendir acetato. Esta reacción tiene lugar exclusivamente en la mitocondria (Cronholm 1985).



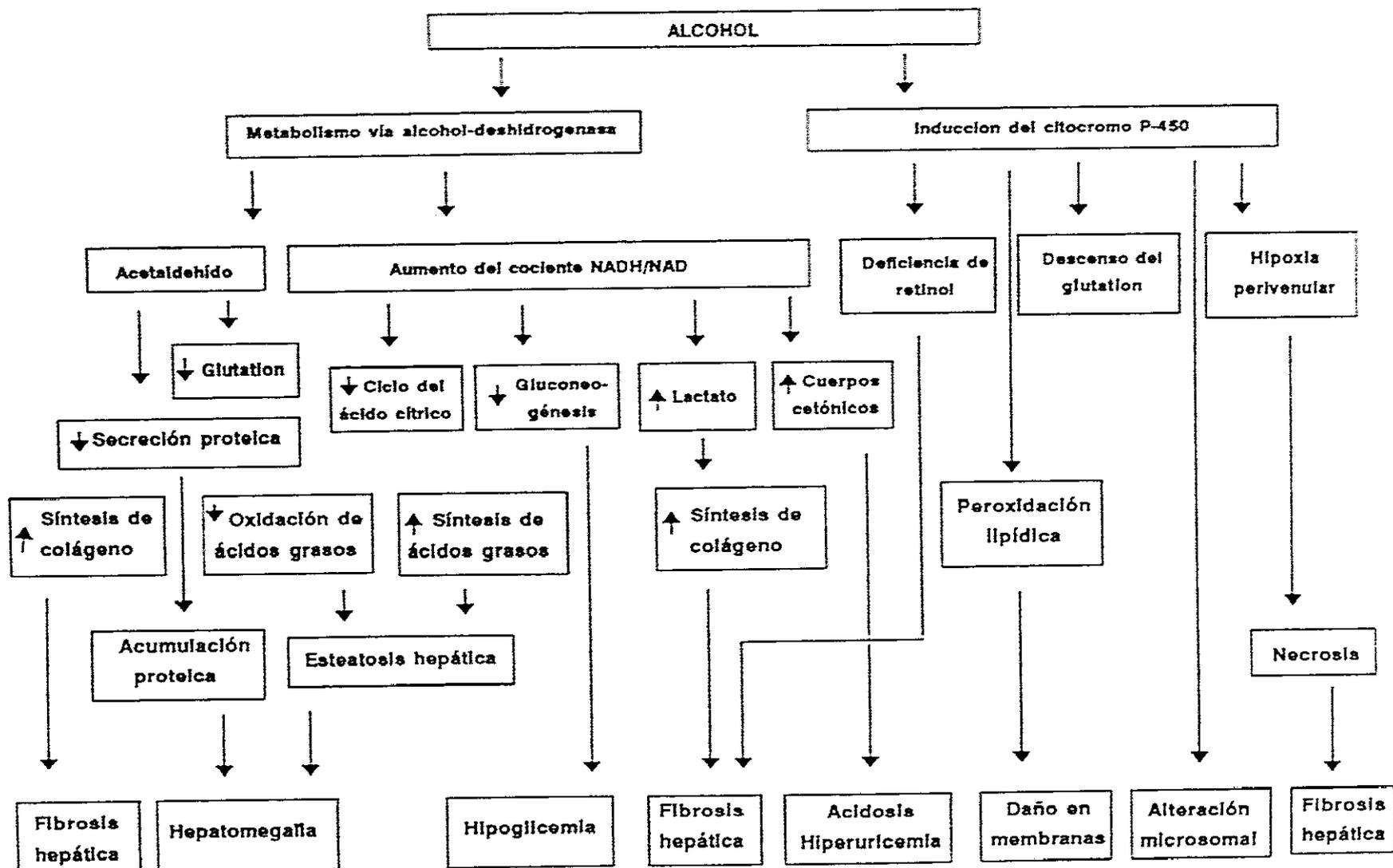
Hepatotoxicidad

El abuso del alcohol etílico se ha mostrado como un factor capaz de promover alteraciones estructurales y funcionales extendidas a todos los sistemas del organismo, y dentro de ellos, fundamentalmente en el hígado (Schüller 1991). Tradicionalmente, los desórdenes metabólicos descritos en el hígado han sido atribuidos a las deficiencias nutricionales que acompañan al alcoholismo (Lieber 1988b). Sin embargo, estudios llevados a cabo en las tres últimas décadas implican al alcohol como factor etiológico directo de la hepatopatía alcohólica como ya sugirieron Lieber y cols. en 1965.

El etanol, a diferencia de otras fuentes importantes de energía, no se puede metabolizar ni almacenar en grado alguno en los tejidos periféricos. Esta relativa especificidad del alcohol por su oxidación en el hígado, somete al hepatocito a una sobrecarga funcional que produce los desequilibrios metabólicos hepáticos propios de la enfermedad alcohólica (Figura 9) (Lieber 1991a).

La oxidación del etanol aumenta la síntesis de NADH y la relación NADH/NAD, fundamentalmente por la acción de la ADH. Esta situación afecta a todas las deshidrogenasas NAD⁺-dependientes de la célula hepática (Baranyai y Blum 1989), afectando gravemente el metabolismo intermediario. En estas circunstancias, se produce una inhibición de la gluconeogénesis por una intensa conversión del piruvato en lactato, originándose hiperlactacidemia (Lieber

Figura 9.- Influencia del alcohol en el metabolismo hepático.



1991b). El aumento de lactato estimula la colagenización por la estimulación de la prolinhidroxilasa hepática (Feinman y Lieber 1972).

Cuando existe un abuso en el consumo de etanol, parte del exceso de los equivalentes de reducción son lanzados al interior de la mitocondria mediante la lanzadera malato-aspartato. Estos equivalentes sustituyen a los del ciclo del ácido cítrico, fuente de H^+ habitual para la cadena electrónica mitocondrial, lo que implica, a su vez, una menor oxidación de ácidos grasos, fenómeno relacionado con la génesis del hígado graso (Lieber 1988a). Por otra parte, el aumento de NADPH estimula la síntesis hepática de ácidos grasos desde acetyl-CoA (Gordon 1972).

Las reacciones oxidativas que tienen lugar en el MEOS requieren oxígeno y NADPH, mientras que las vehiculadas por la vía de la ADH requieren NAD y generan NADH, que se reoxida por su acoplamiento a la fosforilación oxidativa. El etanol al oxidarse origina un alto consumo de oxígeno (Trémolières y Carré 1961), y genera un alto gasto de energía en parte por el aumento de la actividad de la ATPasa y también por su estimulación del catabolismo proteico.

El acetaldehído, metabolito producido como consecuencia de la oxidación del etanol, es un compuesto muy tóxico y de alta reactividad. Tiene la capacidad de unirse a proteínas plasmáticas y de membrana formando agregados neoantigénicos (Lin y cols. 1989). En el consumo crónico de etanol, se provoca una disminución de la oxidación mitocondrial de acetaldehído, acumulándose este metabolito, que produce daños en las membranas celulares y subcelulares (Brunt 1988), así como producción de peroxidación lipídica (Dianzani 1985) con alteración del sistema de glutatión (Fernández-Checa 1989). También, desplaza al piridoxal fosfato en su unión con proteínas, lo que conduce a la degradación de la vitamina B_6 (Veitch y cols. 1975). Actualmente, el acetaldehído es considerado como el factor tóxico iniciador de las lesiones hepáticas.

Efecto sobre la porfirinosíntesis

La administración crónica de etanol induce la síntesis de una hemoproteína, el citocromo P-450E1 (Ohnisi y Lieber, 1977); por otro lado, la ingesta etílica crónica se suele acompañar de una excreción urinaria aumentada de porfirinas (Orten y cols. 1963), lo cual pone de manifiesto que la biosíntesis del hemo es una ruta diana para la toxicidad del etanol.

El etanol causa notables alteraciones en la actividad de varias enzimas de la porfirinosíntesis (Figura 10). El aumento del cociente NADH/NAD hepatocelular incrementa la ruta del fumárico a succínico, aumentando así la concentración de uno de los sustratos del ALA-S (Labbe y cols. 1970). La actividad de esta enzima aparece incrementada en hígado de rata crónicamente alcohólica (Badawy y cols. 1989). Li y cols. (1989) no encontraron diferencias en las actividades hepáticas de la COPRO-OX, PROTO-OX y Fe-Q en pacientes alcohólicos y sujetos sanos. Sin embargo, la actividad hepática de la URO-D sí se mostró deprimida en ratas alcohólicas (Doss y cols. 1981).

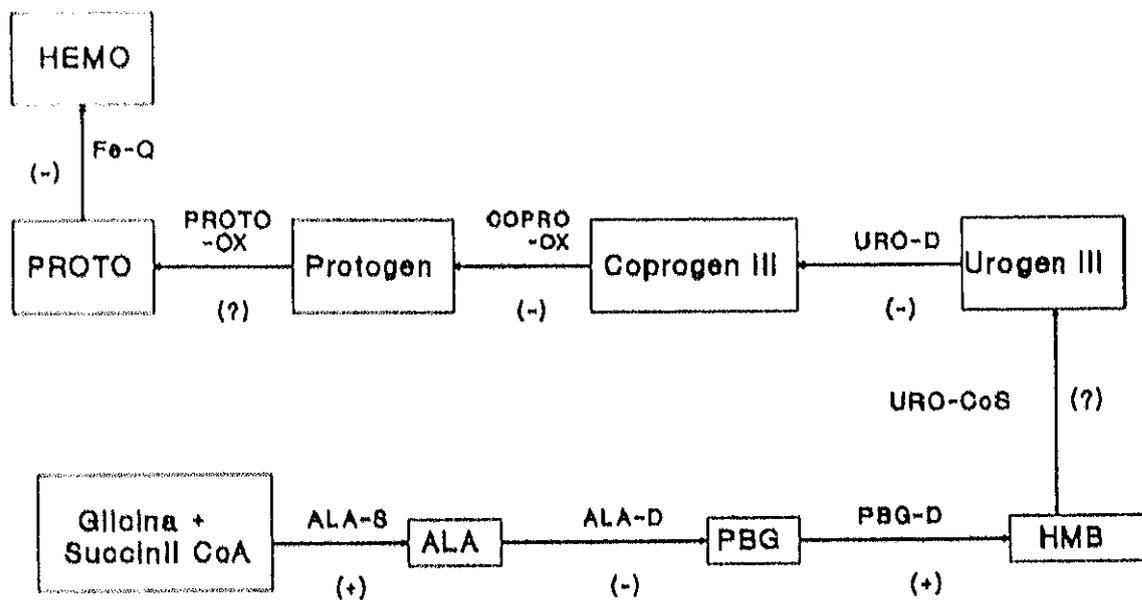
Por otra parte, la actividad de la ALA-D disminuye en hematíes (McColl y cols. 1981) y en hígado (Kondo y cols. 1983), probablemente debido a la acción tóxica del acetaldehído (Solomon y Crouch 1990). Sieg y cols. (1991) han propuesto la actividad eritrocitaria de esta enzima como marcador de la intoxicación alcohólica.

McColl y cols. (1980) encontraron cambios acusados en la actividad de seis enzimas de la biosíntesis del hemo en eritrocitos tras la administración aguda de etanol a voluntarios. La actividad de la ALA-S y de la PBG-D aparecía incrementada, mientras que el resto de las enzimas aparecían deprimidas (ALA-D, URO-D, COPRO-OX y Fe-Q). Estudiando las mismas enzimas en pacientes alcohólicos crónicos, McColl y cols. (1981) observaron un incremento de la actividad en la ALA-S y un descenso en la ALA-D y la URO-D. Sin embargo, todas estas enzimas retornaban a

una actividad normal después de veinte días de abstinencia de etanol.

Figura 10.- Efecto del etanol sobre la síntesis del hemo

Tomado de Sleg y cols.



CAPITULO VI.- PLOMO

Epidemiología de la intoxicación plúmbica

El plomo es un metal pesado de aspecto azulado brillante que, dadas sus propiedades para la industria, se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente (World Health Organization 1989). Su toxicidad es conocida desde muy antiguo, y existen más de un centenar de actividades industriales que implican riesgo de exposición al metal: fundición de plomo, fábricas de baterías y de pinturas, empleados de gasolineras, soldaduras y un largo etcétera en función de la gran ubicuidad de la aplicación industrial del plomo (Thacker y cols. 1987; Goldman y cols. 1987; Sun y cols. 1992). Flegal y Smith (1992) han estimado que la plumbemia media en la sociedad de la época preindustrial era entre 50 y 200 veces menor que los más bajos niveles de plomo actualmente detectados en individuos de las más agrestes zonas del planeta.

Se han observado también casos de intoxicación accidental por plomo contenido en vasijas vitrificadas (Hernández y cols. 1987) y en heroína contaminada (Parras y cols. 1987). Sills y cols. (1991), consideran que los alimentos, especialmente los enlatados, constituyen la principal vía de intoxicación en la población adulta.

La presencia de plomo en el aire proviene fundamentalmente de la combustión de gasolinas plomadas y de la acción de las fundiciones. El umbral de la concentración de plomo inocua para la salud ha sido fijado en $1.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de aire como media durante 90 días (Gerson 1990). El plomo proveniente de pinturas plomadas puede adherirse a las motas de polvo del aire y constituir una importante vía de intoxicación pediátrica dentro de las casas (Charney y cols. 1983).

La población infantil a través de su actividad exploratoria oral y su juego cotidiano, presenta grandes

posibilidades de contacto con el metal tóxico. Además, los niños absorben aproximadamente el 50% del plomo ingerido, frente al 8-10% de los adultos (Alperstein y cols. 1991). También se han descrito intoxicaciones tras la adición de agua contaminada con plomo a biberones o por la cocción de preparados infantiles en utensilios de cerámica (Shannon y Graef 1992).

Particular importancia han cobrado los trabajos realizados en los últimos años en Norteamérica, Reino Unido y Australia, que relacionan bajos niveles de exposición al plomo en niños (entre 10-25 $\mu\text{g}/\text{dL}$ de sangre) con malos resultados en los test de coeficiente intelectual y con trastornos en el comportamiento escolar (Baghurst y cols. 1992; Fulton y cols. 1987).

En un estudio retrospectivo, Needleman y cols. (1990) constataron que las deficiencias cognitivas observadas entre 1975 y 1978 en niños con niveles de plomo relativamente bajos, persistían 11 años después en la juventud, en relación con jóvenes que no mostraban exposición al metal. Bellinger y cols. (1987) comprobaron que plumbemias incluso inferiores a 25 $\mu\text{g}/\text{dL}$ en madres embarazadas, afectaban el posterior desarrollo cognitivo del recién nacido.

Aunque es generalmente aceptada la inversa relación entre inteligencia y niveles de plomo, Thacker y cols. (1992) detectan inconsistencias en el método seguido en estos trabajos, mientras otros estudios no han encontrado esta relación con las mismas concentraciones de plomo (Harvey y cols. 1984). Un factor a considerar es la detección de deficiencias de hierro en un 86% de niños con tasas moderadamente altas de plomo (Yip y cols. 1981). Este factor se ha mostrado *per se* como perturbador del comportamiento y del desarrollo mental en la infancia (Walter y cols. 1983). Tras haberse constatado recientemente que el plomo puede inducir efectos nocivos incluso ante muy bajas concentraciones, las tasas de plumbemia consideradas hasta hace poco como seguras, han sido modificadas. El Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América (Center for Disease

Control, CDC) propuso la utilización de la protoporfirina eritrocitaria (PPE)- también medida como zinc-protoporfirina (ZPP) en hematofluorímetros- como test rápido de detección de la intoxicación. Este mismo centro ha rebajado en 1991 el nivel de plumbemia inocuo para la salud en niños desde 25 µg/Dl a 10 µg/Dl (Ernhart 1992). En un reciente editorial, Sayre (1992) se ha mostrado en desacuerdo con esta rebaja por el alto coste que implica, ya que el 40% de los niños de EE.UU presentarían tasas de plomo consideradas como perjudiciales para la salud (Rosen 1992).

Los estudios poblacionales llevados a cabo utilizando ZPP como test rápido (Zwennis y cols. 1990; Parsons y cols. 1991) han puesto de manifiesto la utilidad de este parámetro en la detección del saturnismo subclínico ante plumbemias superiores a 25 µg/Dl. Sin embargo, Turk y cols. (1992) a la vista de las nuevas normativas, califican el test de la ZPP como insensible y proponen encaminar los esfuerzos de la administración a promover la medición directa de plomo en sangre como test discriminativo.

Distribución del plomo en el organismo

Inicialmente, la mayoría del plomo absorbido se acumula en los eritrocitos, ligándose a la hemoglobina y a otras proteínas. Existe una lenta transferencia del plomo desde la sangre a otros tejidos blandos y finalmente al hueso. La carga de plomo corporal se distribuye así en un modelo tricompartmental, tal y como demostró Rabinowitz y cols (1973). Estudios de autopsias han demostrado que el 90-95% de la carga corporal de plomo se encuentra en el hueso y en los dientes (Gerson 1990).

El tejido óseo parece tener dos reservorios de plomo: uno inerte y con una vida media de décadas y otro lábil e intercambiable con la sangre. Esta circunstancia permite la posibilidad de que el saturnismo sea una entidad posible años después de la exposición al metal (González y cols. 1990). En este sentido, la medición de la plumburia provocada mediante la

administración de un quelante (EDTA disódico cálcico) (Cory-Sletcha y cols. 1987), la fluorescencia ósea de rayos-x (Price y cols. 1992) o la medición de plomo en biopsias de huesos (Sánchez-Fructuoso y cols 1992), han mostrado su eficacia en la medición de la carga corporal de plomo.

Toxicidad

Muchos de los rasgos clínicos de la intoxicación plúmbica derivan de los evidentes efectos que el plomo ejerce sobre la síntesis del hemo y que conducen, en los casos más manifiestos, a la aparición de anemia. Estos efectos traen consigo el incremento de los niveles de ALA en plasma y orina por la inhibición de la enzima ALA-D y una actividad incrementada de la ALA-S. También se observa un incremento de la coproporfirinuria y de la tasa de protoporfirina eritrocitaria (PPE) (Moore 1986). El efecto del plomo sobre las enzimas COPRO-OX y Fe-Q sigue siendo objeto de discusión (Rossi y cols. 1990; Labbe 1990).

La acción inhibitoria del plomo sobre la ALA-D ha sido ampliamente registrada en la literatura científica y observada en grado variable en la mayoría de los tejidos, incluido el nervioso (Moore 1991). La actividad eritrocitaria de esta enzima es utilizada en la detección precoz del saturnismo (Hueso y cols. 1989), al ser su inactivación patente ante tasas de plumbemia observadas en la población general urbana sin riesgo de exposición al metal (Hernberg y Nikkanen 1970). La enzima resulta inhibida al quedar desplazado el zinc por el plomo, que forma un puente con dos grupos -SH adyacentes (Dent y cols. 1990).

Fujita y cols. (1981) utilizaron la técnica de radioinmunoensayo para medir la cantidad de la enzima ALA-D presente en eritrocitos tras la administración de plomo. Comprobaron que la síntesis de la enzima se encontraba incrementada, sin existir aumento del número de reticulocitos. Por otra parte, Wetmur y cols. (1991) sugieren una susceptibilidad genética de las dos isoenzimas descritas para la

ALA-D que son expresión de dos alelos comunes (ALA-D¹ y ALA-D²) en la intoxicación por plomo. Proponen que la sustitución de un residuo de lisina por otro de asparragina alteraría la estructura cuaternaria de la enzima, incrementando su afinidad por el plomo.

El resultado inmediato de la inhibición de la actividad de la ALA-D, es la acumulación de ALA, cuya aparición en orina aparece incrementada (Tomokuni y cols. 1991). Sin embargo, el mismo grupo investigador (Tomokuni y Ichiba 1990) comprobó en ratones, que un pretratamiento con una dosis única intraperitoneal de plomo, reducía la excreción incrementada de ALA tras una nueva exposición al metal. Este hecho indica que la acumulación de ALA en orina podría normalizarse en la intoxicación crónica.

El incremento de la coproporfirinuria es una respuesta más retardada en el saturnismo (Omae y cols. 1988), y tradicionalmente se ha asociado con un déficit adquirido de la COPRO-OX. Sin embargo, existen pocos estudios en relación con la inhibición de esta enzima mitocondrial. Batlle y cols (1965) estudiaron la actividad *in vitro* de la COPRO-OX hepática y sólo obtuvieron una inhibición del 20% con una concentración comparativamente grande de plomo. Rossi y cols. (1990) no han encontrado deficiencia enzimática de la COPRO-OX en linfocitos de trabajadores expuestos al plomo, y sugieren que la elevada excreción de coproporfirina en el saturnismo puede deberse a la afinidad del plomo a depositarse en las mitocondrias de las células renales, interfiriendo en el transporte del coproporfirinógeno desde el citosol al espacio intermembrana, lugar donde se ubica la COPRO-OX (Fowler y cols. 1980).

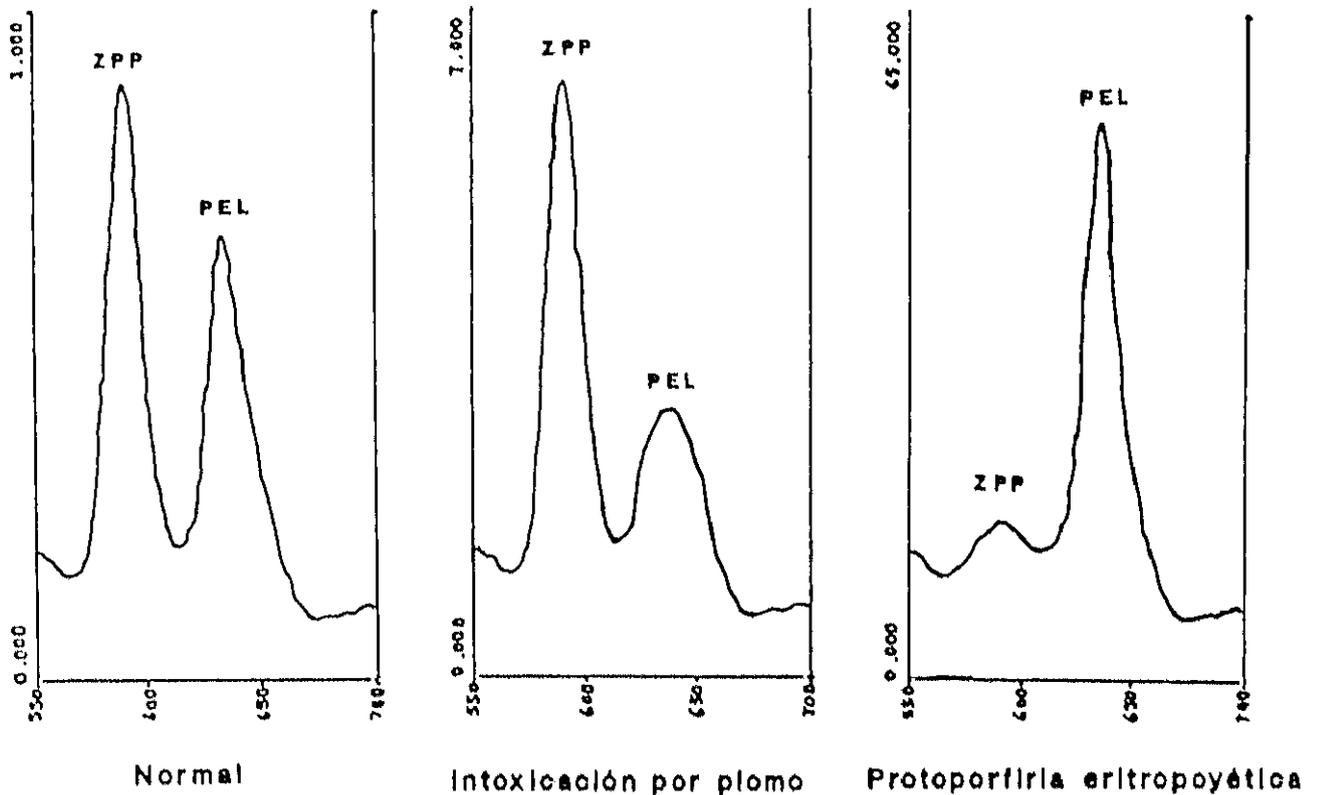
Con un razonamiento similar, el incremento en la tasa de ZPP en la exposición al plomo ha sido relacionada con una inhibición de la Fe-Q tal y como describieron Campbell y cols. (1977) en el mismo trabajo en el que refirieron la inhibición de la COPRO-OX mencionada anteriormente. Rogan y cols. (1986) incluso estimaban la inhibición en el último paso de la porfirinosíntesis en razón

al aumento objetivado de la ZPP. Sin embargo, recientes estudios (Rossi y cols. 1990) favorecen la hipótesis de una inhibición de la NADH-ferricianida reductasa, enzima que permite la indispensable reducción del hierro al estado ferroso para su utilización por la Fe-Q. En esta situación, la inespecífica Fe-Q incluiría el zinc como sustrato alternativo en el anillo porfirínico, con el consiguiente aumento de la concentración de ZPP en el hematíe.

En condiciones fisiológicas existe en el hematíe una mayor concentración de ZPP que de protoporfirina libre (PEL). En la anemia ferropénica, se da una circunstancia similar a la observada en la intoxicación por plomo, al aumentar la concentración de ZPP, constituyéndose éste parámetro como un indicador de deficiencia de Fe (Labbé 1990). También en la protoporfiria eritropoyética se produce un aumento global de PE; en este caso, el zinc no es capaz de quelar la gran concentración de PE acumulada, por lo que la fracción libre (no unida al zinc) aparece como mayoritaria (Figura 11). Schwartz y cols. (1980) demostraron que en la intoxicación aguda por plomo en conejos se producía un aumento inicial de la fracción libre de la protoporfirina, seguida de la aparición de la forma quelada. Recientemente, Sassaroli y cols. (1992) han desarrollado un método citométrico de fluorescencia en el que determinan una diferente distribución celular de la ZPP en pacientes expuestos a la acción del plomo y en sujetos sanos.

La actividad catalítica de la ALA-S hepática, enzima reguladora de la ruta biosintética del hemo, aparece incrementada en la exposición aguda al plomo (Cánepa y cols. 1990; Maxwell y Meyer 1976) probablemente por una disminuída formación de hemo que actuaría como inductor de esta enzima. El marcado incremento de la actividad de la HEMO-OX inducido por el plomo (Moore 1986), reduciría los niveles de hemo contribuyendo así a la activación de la ALA-S.

Figura 11.- Distribución de la Zn-Protoporfirina (ZPP) y de la Protoporfirina libre (PEL) en diferentes estados.



Espectro de emisión entre 550 y 700 nm, fijando la excitación en 415 nm.

La activación de la ALA-S hepática en la exposición prolongada del metal es más incierta, pues Tomokuni y cols. (1991) no evidencian alteración de esta enzima tras 14 días de tratamiento con dosis moderadas de plomo en el agua de bebida. Por su parte, Moore y cols. (1975) no detectaron cambios en su actividad en la intoxicación crónica. Los ya mencionados Maxwell y Meyer (1976) comprobaron que pequeñas dosis de plomo, aunque sólo incrementan ligeramente la actividad de la ALA-S, elevan considerablemente la sensibilidad de esta enzima para su inducción por fármacos tales como el fenobarbital.

El citocromo P-450 es una hemoproteína oxidasa terminal del sistema microsomal hepático cuya actividad se ve severamente reducida en la intoxicación aguda por plomo (Hjelle y cols. 1982; Alvares y cols. 1975). Este efecto se debe a que el plomo altera

directamente los grupos -SH relacionados con la función de transferencia de electrones del cit P450. Sin embargo, en la intoxicación crónica no se ha podido objetivar este descenso. Por otra parte, existe un buen número de tóxicos y fármacos que inducen la actividad del cit P450. La administración conjunta de fenobarbital y plomo (Maxwell y Meyer 1972; Hjeller y cols. 1982) redujo la incrementada actividad del cit P-450 observada con la administración aislada de fenobarbital.

Rosen y cols. (1980) comprobaron que concentraciones de plomo en sangre entre 15-20 µg/dL reducían los niveles de la forma activa de la vitamina D interfiriendo en la actividad de la 1,25 dihidroxicolecalciferol L-hidroxilasa. Esta interferencia podría tener lugar también en la síntesis del hemo, ya que esta enzima es un complejo del citocromo P450. En otros estudios, Hernberg y cols. (1967) estudiaron cómo una plumbemia de 20 µg/dL o superior, inhibe la actividad de la ATPasa sodio-potasio e interfiere en la respiración celular, desacoplando la fosforilación oxidativa (Holtzman y Shen-Shu 1976).

El ALA acumulado tras la inhibición de la ALA-D, compite en el cerebro por los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA) debido a su gran similitud estructural. Esta circunstancia puede ser la causante del excitable comportamiento observado en la intoxicación saturnina (Brennan y Cantrill 1979). Otros estudios (Lester y cols. 1986), han sugerido que el plomo interfiere con los procesos neuronales calcio-dependientes que regulan la liberación de ciertos neurotransmisores.

Otro indicador de cambio neuronal asociado con el déficit de hemo, es la severa inhibición que sufre la hemoproteína triptófano pirrolasa. Su sustrato, el triptófano, toma caminos metabólicos alternativos para rendir serotonina, melatonina y ácido 5-OH indolacético que conducen a las manifestaciones neuronales típicas del saturnismo, similares a las observadas en la porfiria aguda intermitente (Moore 1986).

El efecto del plomo sobre la concentración hepática de glutatión reducido (GSH) fue estudiado por Battle y cols. (1986); en sus trabajos constataron disminuidas concentraciones de GSH tras la intoxicación por plomo aguda o crónica. Por el contrario, Corongiu y Milia (1982) observaron un aumento de los depósitos hepáticos de este tripéptido tras la administración crónica de nitrato de plomo a ratas. Kewata y Suzuki (1983) observaron contenidos reducidos de GSH hepático tras la administración aguda de cadmio, zinc o cobre y explicaron este fenómeno por una mayor utilización de la cisteína, aminoácido utilizado en la síntesis de la metalotioneína, proteína inducible que se une a metales tóxicos reduciendo su toxicidad. Goering y Fowler (1987) observaron que un pretratamiento con zinc o cadmio en ratas, provocaba un aumento de las Cd,Zn-metalotioneínas que atenuaron el efecto *in vitro* del plomo sobre el ALA-D.

Existen suficientes evidencias que relacionan la impregnación por plomo en el organismo con la aparición de una nefropatía progresiva (Staessen y cols. 1992) que generalmente cursa con hipertensión y/o hiperuricemia. Batuman y cols. (1983) estudiaron 27 pacientes hipertensos con insuficiencia renal y encontraron en 18 de ellos elevadas tasas de plumburia provocada tras la administración de EDTA disódico cálcico. En nuestra unidad de investigación, hemos estudiado 11 pacientes nefrópatas con plumburia patológica en los que la actividad de la ALA-D eritrocitaria se mostró como el indicador metabólico más sensible de este saturnismo asintomático (Santos y cols. 1993).

Se han descrito en la intoxicación plúmbica alteraciones en la vía metabólica de los nucleótidos por inhibición de la enzima pirimidina 5'nucleotidasa globular (Tomokuni y cols. 1989). Esta enzimopatía es la causante del característico punteado basófilo eritrocitario del saturnismo, tal y como ocurre en la deficiencia congénita de esta enzima (Valentine y cols. 1974). La sensibilidad de este marcador de intoxicación es alta (el umbral de no efecto se sitúa en 10-20 µg/Dl de plumbemia) y la simplificación de su medición llevada a cabo por Sakai y Ushio

(1986) utilizando cromatografía líquida de alta presión favorece su utilización en la detección del saturnismo subclínico. No obstante, la actividad eritrocitaria de la ALA-D continúa siendo el marcador más temprano de intoxicación.

CAPITULO VII.- S-ADENOSIL-L-METIONINA

Características y metabolismo

La S-Adenosil-L-Metionina (SAdMe) (Figura 12) es un compuesto fisiológico presente en todos los tejidos del organismo y que interviene en importantes procesos metabólicos como son las reacciones de transmetilación, transulfuración y aminopropilación (Stramentinoli 1987). Es, junto con la adenosina trifosfato, la molécula que participa como cofactor en mayor número de reacciones enzimáticas. En la figura 13, se puede observar un esquema simplificado del metabolismo de la metionina y de su producto metabólicamente activo, el SAdMe.

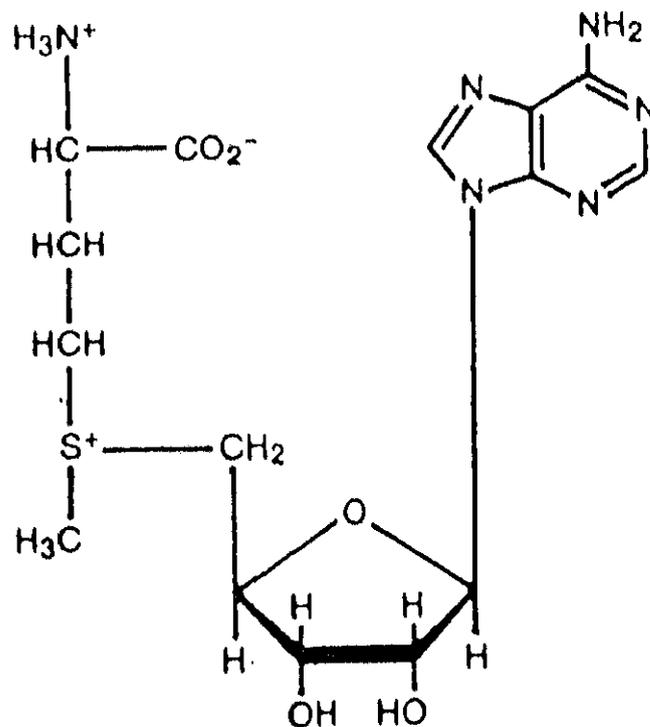
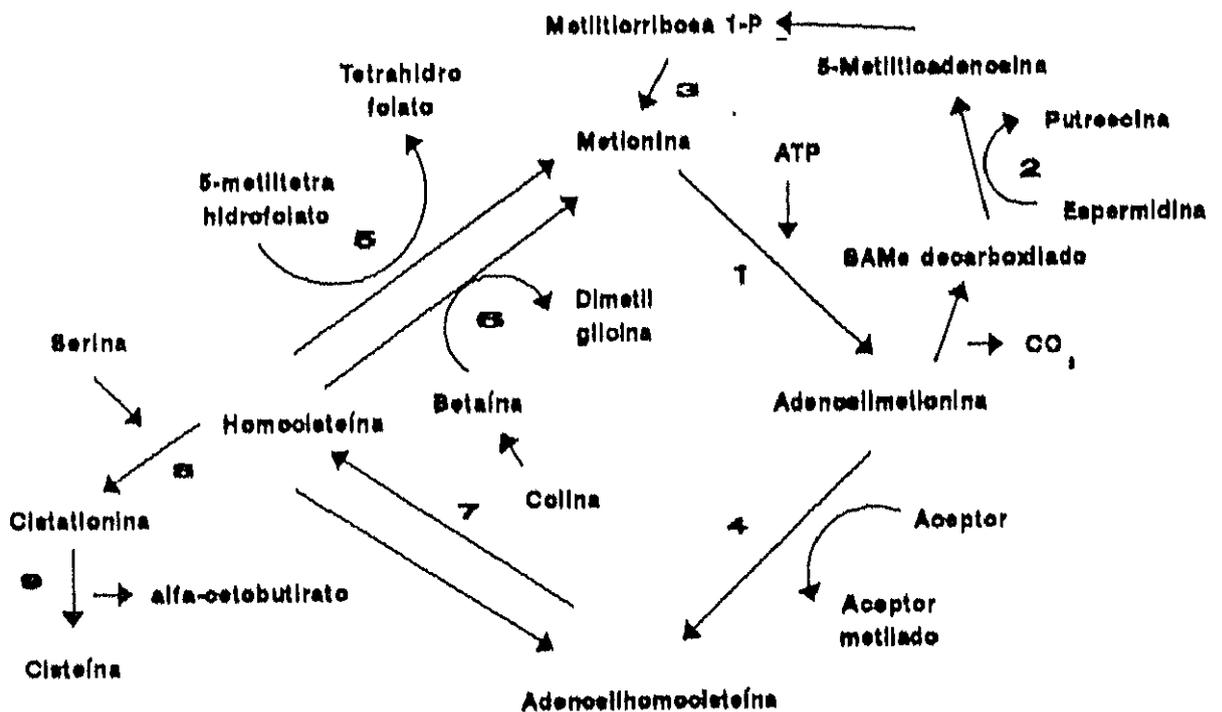


Figura 12.- Estructura de la S-Adenosil-L-Metionina

En mamíferos, el 48% de la metionina es metabolizada en el hígado, y la mayoría de ella (alrededor de un 80%), es convertida en SAdMe (Mudd y Poole 1975). La síntesis de SAdMe se realiza

utilizando ATP a través de la reacción catalizada por la enzima metionina adenosil transferasa (MAT), también llamada SAdMe sintetasa (EC 2.5.1.6) (fig 13; reacción 1). Tanto en humanos como en la rata, la MAT hepática está formada por un tetrámero en equilibrio con un dímero (Cabrero y cols. 1987). En condiciones fisiológicas, la forma enzimática de alto peso molecular es quince veces más activa que la forma dimérica. Corrales y cols. (1991), observaron que la enzima purificada de hígado de rata era rápidamente inactivada por la modificación de dos residuos de cisteína. En este sentido, el glutatión juega un importante papel en el mantenimiento de los grupos tiólicos presentes en la MAT.

Figura 13.- Esquema del metabolismo hepático del SAdMe
Tomado de Finkelstein



En la mayoría de los tejidos, la síntesis de poliaminas (aminopropilación) aparece como una vía menor en el metabolismo de la metionina (Mudd y Poole 1975). La descarboxilación del SAME da lugar a su análogo descarboxilado, que posteriormente transferirá su grupo aminopropilo a la putrescina para así dar lugar a las poliaminas (Fig 13; reacción 2). Backlund y cols. (1982) demostraron la existencia de un ciclo que permitía la resíntesis de metionina desde la metiltiorribosa-1-fosfato. Por lo tanto, no hay pérdida de metionina durante la síntesis de poliaminas (Fig 13; reacción 3).

La concentración de SAM en mamíferos está en función de cada tejido específico y de la disponibilidad de metionina. La concentración oscila entre 50 y 100 nmoles /g en los hígados de ratas alimentadas con dietas estándar. Estos valores están en el orden de magnitud de la mayoría de las transmetilasas y descarboxilasas dependientes de SAME (Finkelstein 1990).

El SAME es el principal agente metilante de un gran número de reacciones de transmetilación (Fig 13; reacción 4) vitales en el organismo, como son la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Paik y Kim 1990). Una importante excepción a esta regla general es la metilación de la homocisteína para rendir metionina, en la cual el agente metilante es el 5'-metiltetrahidrofolato o la betaína, catabolito obligado de la colina (Fig 13; reacciones 5 y 6).

También se ha demostrado el decisivo papel de la metilación secuencial de fosfolípidos en la fluidez de la membrana, en el transporte de metabolitos a través de ella, y en la transmisión de señales biológicas (Hirata y Axelrod 1980).

En el proceso de metilación, el SAME es convertido en S-Adenosilhomocisteína. Esta molécula actúa como inhibidor competitivo en todas las reacciones en las que forma parte el SAME como donador de grupos metilo (Chawla y cols. 1990). La posterior hidrólisis de este compuesto por la adenosilhomocis-

teinasas (Fig 13; reacción 7) es una reacción reversible cuya termodinámica favorece su síntesis. El producto de esta enzima, la homocisteína, constituye el punto de comienzo de la importante vía fisiológica de la transulfuración.

Reacciones de transulfuración: el glutati6n (GSH)

El proceso de transulfuraci6n, realizado exclusivamente en el h6gado, tiene como resultado final la transferencia del 6tomo de azufre de la metionina al esqueleto carbonado de la serina para producir ciste6na (Reed y Orrenius 1977). La homociste6na producida en las reacciones comentadas anteriormente, se condensa con la serina dando cistationina en una reacci6n catalizada por la cistationina sintetasa (Fig 13; reacci6n 8). La escisi6n de la cistationina por la cistationasa produce ciste6na libre que puede ser utilizada en la s6ntesis de GSH (Fig 13; reacci6n 9).

La s6ntesis de GSH a partir sus amino6cidos precursores tiene lugar en el citosol mediante la acci6n de dos actividades enzim6ticas independientes. En la primera etapa, que es tambi6n la etapa limitante, el glut6mico y la ciste6na se unen mediante la enzima gamma-glutamil-ciste6na sintetasa, hidrolizando una mol6cula de ATP. Esta enzima es susceptible de inhibirse por el GSH en un proceso *feed-back*. La s6ntesis de GSH est6 limitada por la disponibilidad de ciste6na en el hepatocito. En un segundo paso, la GSH-sintetasa a6ade la glicina al dip6ptido ya formado para producir GSH con nuevo gasto de ATP.

El GSH (Figura 14) es un agente reductor que desempe6a un papel esencial en la protecci6n celular contra la acci6n lesiva de los radicales libres de ox6geno, reduciendo el per6xido de hidr6geno. Esta reacci6n se lleva a cabo mediante la acci6n de una enzima dependiente de selenio, la GSH-peroxidasa con producci6n de glutati6n oxidado (GSSG). La reducci6n de per6xidos de hidr6geno mediante esta peroxidasa, es m6s importante fisiol6gicamente que la realizada por la catalasa, cuya acci6n queda restringida a los peroxisomas (Stadtman 1980). El papel del

GSH en la protección contra especies reactivas de oxígeno en la hepatopatía alcohólica, se esquematiza en la figura 15.

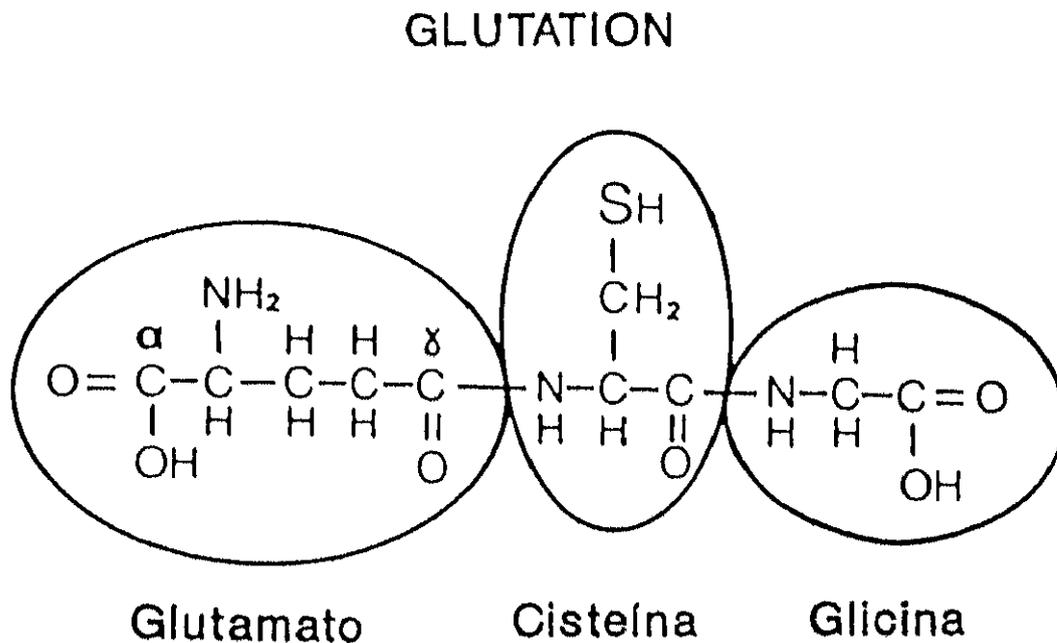


Figura 14.- Estructura del glutatión

La rápida reducción del GSSG a GSH es fundamental en el mantenimiento del estado normal de óxido-reducción de los grupos -SH en la célula. Este proceso se lleva a cabo por la acción de la GSSG reductasa, siendo el NADPH el aportador electrónico. La alteración del cociente GSH/GSSG que fisiológicamente oscila entre 250-300 puede tener consecuencias adversas debido a la alteración de la actividad fisiológica de ciertas enzimas, entre ellas el ALA-D, cuya función biológica depende de la existencia de grupos -SH libres (Bellomo y Orrenius 1985). Asimismo, la formación de enlaces disulfuro con los grupos -SH de proteínas se lleva a cabo por la acción de la tiol-transferasa (Axelsson y cols. 1978).

Otro aspecto fundamental de la función del GSH lo representan las reacciones catalizadas por las GSH- transferasas, familia de enzimas que participan en la desintoxicación de grupos electrofílicos presentes en xenobióticos, al reaccionar con el grupo nucleófilo del GSH (Ketteter 1986).

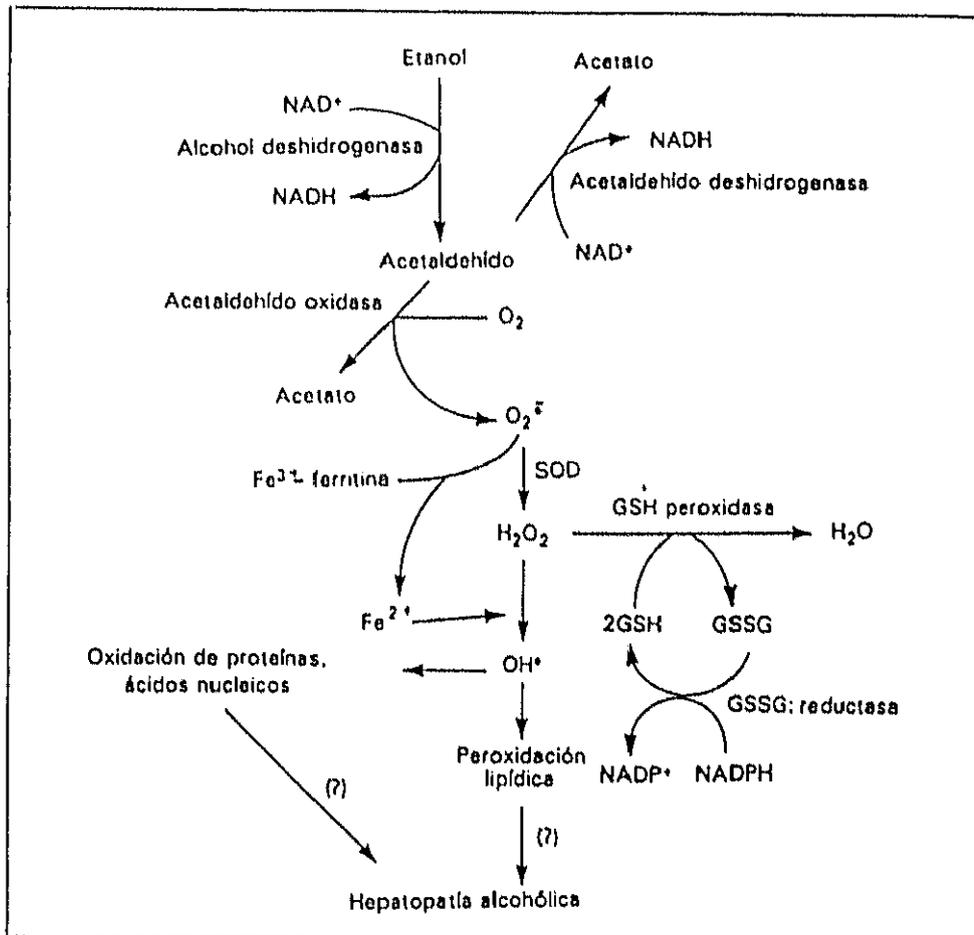


Figura 15.- Protección del GSH en la producción de especies reactivas de oxígeno en la hepatopatía alcohólica

Tomado de Fernández-Oheca

Finalmente, el GSH participa en el metabolismo de prostaglandinas y leucotrienos, reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos y en la modulación de procesos de formación microtubular (Deleve y Kaplowitz 1990).

Es generalmente aceptada la teoría de que el alcohol administrado de forma aguda en la rata produce una disminución significativa del contenido hepático de GSH. Viña y cols. (1980) han explicado este fenómeno por la formación de un aducto del GSH con el acetaldehído. Más recientemente, Speisky y cols. (1988) sugerían que esta pérdida de los niveles de GSH era debida a cambios hormonales inducidos por el alcohol que incrementaban el eflujo sinusoidal de GSH desde el hígado.

El estudio del efecto de la intoxicación crónica por etanol en el GSH hepático es un tema en discusión debido a la gran variedad de resultados obtenidos. Jewell y cols. (1986) al estudiar pacientes afectados de hepatopatía alcohólica, encontraron bajas concentraciones de GSH. Apuntaban que esta reducción podría deberse a la unión con el acetaldehído y a la oxidación masiva de GSH a GSSG por la GSH-peroxidasa. Se ha propuesto un mecanismo por el cual el etanol activaría el catabolismo del GSH, al incrementar la actividad de la gamma-glutamyl transpeptidasa (Lieber 1991a). Yang y Carlson (1991), encontraron un aumento del contenido hepático de GSH en la intoxicación experimental por etanol y sugerían que podría tratarse de un mecanismo adaptativo de defensa celular.

Hirano y cols. (1992), tras administrar etanol crónicamente a ratas por infusión intragástrica, han observado una importante reducción en las tasas de la fracción mitocondrial del GSH hepático debida a una deficiente captación de este tripéptido. Sin embargo, esta intoxicación crónica no modificó el *pool* citosólico de GSH.

Terapéutica con SAME en las hepatopatías

Horowitz y cols. (1981) mostraron un desequilibrado metabolismo de la metionina en pacientes con cirrosis respecto de otro grupo de sujetos normales. Estos últimos excretaron, tras una sobrecarga de metionina, un 71% de este aminoácido, frente al 38% excretado por los cirróticos sin que existiera acumulación de

intermediarios. Estudios posteriores (Duce y cols. 1988) demostraron una reducción en la actividad de la MAT y de las metiltransferasas hepáticas en pacientes con cirrosis alcohólica y posthepatítica. También comprobaron una inadecuada síntesis de compuestos sulfurados como el GSH, que es el principal agente detoxificador celular.

La deficiencia de SAME, consecuencia de la inhibición de su síntesis, provoca una reducción en la ya mencionada metilación de fosfolípidos de membrana. Recientemente, Kakimoto y cols. (1992) sugirieron que el SAME provoca una reducción del cociente colesterol libre/ fosfolípido, lo que se traduce en una mayor fluidez de la membrana en eritrocitos de pacientes hepatópatas. En un estudio llevado a cabo con ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono (Muriel y Mourelle 1992), se constataron cambios en la actividad de las enzimas transmembranales, y se evidenció la importancia de las reacciones de metilación mediadas por el SAME en el mantenimiento de una función hepática normal.

En otras hepatopatías, como las inducidas experimentalmente por la galactosamina o etanol, se ha constatado una disminución en el contenido hepático de SAME (Stramentinoli y cols. 1978). El efecto protector del SAME se evidenció también en la intoxicación experimental por paracetamol. En este trabajo, Bray y cols. (1992), mediante un tratamiento con SAME, aumentaron las concentraciones plasmáticas y hepáticas de GSH disminuidas por el paracetamol. Ponsoda y cols. (1991) encontraron resultados similares al estudiar el efecto del SAME sobre la reducción en los niveles de GSH inducida en cultivos de hepatocitos humanos por compuestos tales como etanol, heroína, paracetamol o metadona.

El tratamiento con SAME en las hepatopatías es uno de los escasos ejemplos de cómo el reemplazo de una molécula fisiológica cuyos niveles han sido disminuidos por el daño hepático, tiene un efecto terapéutico beneficioso (Williams y Lieber 1990). La alta reactividad del SAME hace a este compuesto muy inestable. Sin

embargo, la síntesis de sales estables del SAME ha permitido su uso en estudios toxicológicos y farmacológicos, así como su aplicación en terapéutica (Stramentinoli 1987). Comparado con la metionina, el tratamiento con SAME tiene la ventaja de obviar el déficit de la síntesis de SAME ya mencionado y evitar los problemas de toxicidad del aminoácido (Regina y cols. 1993).

Vendemiale y cols. (1989) indicaron que el tratamiento con SAME produce una mayor biodisponibilidad de grupos tiólicos que favorecerían las reacciones de transulfuración, que parecen jugar un importante papel en la prevención de la colestasis frecuentemente asociada con el daño hepático. La administración de SAME se mostró útil en el tratamiento de la colestasis intrahepática del embarazo (Reyes 1990), normalizando los índices alterados de función bioquímica (transaminasas, bilirubina conjugada y ácidos biliares).

Feo y cols. (1986), observaron el efecto beneficioso del SAME en la hepatopatía alcohólica, disminuyendo la acumulación de lípidos observada en el hígado de la rata. Más adelante, Lieber y cols. (1990) estudiaron la administración oral de SAME a mandriles intoxicados con etanol mediante una dieta líquida que contenía el 50% de las calorías como etanol. El SAME produjo una disminución en el número de mitocondrias gigantes y normalizó la actividad de la succinato deshidrogenasa, enzima marcadora del status metabólico mitocondrial. También evidenciaron tras la intoxicación alcohólica niveles hepáticos disminuidos de SAME y de GSH que fueron restaurados en parte tras el tratamiento con SAME.

El efecto terapéutico de otros compuesto sulfidrílicos como la beta-mercaptoetilamina-HCl, la cisteína y la metionina fueron estudiados por Macdonald y cols. (1977). Estos autores encontraron que la administración de estos compuestos aumentaban la supervivencia de ratas que habían recibido una dosis letal de etanol.

La ingesta crónica de etanol produce una disminución en la síntesis de metionina a través de la vía del tetrahidrofolato (Barak y cols. 1985). Este efecto es compensado por un incremento adaptativo de la actividad metiltransferasa que utiliza betaina como agente metilante, manteniendo así estables los niveles de SAME. La existencia de este mecanismo adaptativo es más eficiente en roedores que en primates, debido a que aquellos contienen mayores niveles de colina oxidasa, y por tanto la producción de betaina es mayor. Esta podría ser una de las razones por las cuales las ratas son menos susceptibles que los babuinos a la hepatopatía alcohólica (Hoffbauer y Zaki 1965).

Sólo unos pocos estudios se han llevado a cabo hasta el momento para estudiar el efecto terapéutico del SAME en las porfirias. Batlle y cols. (1987), trataron a dos niños que padecían porfiria hepatocutánea tarda con SAME administrado oralmente y con bajas dosis de cloroquina (sin realizar flebotomías) y obtuvieron unos resultados esperanzadores aunque no concluyentes.

Cantoni y cols. (1990) administraron SAME subcutáneamente a ratas intoxicadas con hexaclorobenceno, potente inhibidor de la URO-D. Este fármaco indujo una reducción en la acumulación de porfirinas hepáticas pero no evitó la inhibición de la URO-D. Los autores proponen que el efecto sobre la concentración de porfirinas estaría ligado con una mayor disponibilidad celular de ATP tras el tratamiento con SAME.

El grupo argentino de investigación en porfirias (Batlle y cols. 1986), estudió el efecto del SAME en la intoxicación por plomo tanto en humanos como en modelos experimentales de intoxicación aguda o crónica. Este tratamiento proporcionó en todos los casos unos resultados espectaculares sobre la recuperación de la ALA-D, sensible marcador enzimático de la intoxicación saturnina. Estos efectos beneficiosos del SAME se relacionaron con la normalización en la concentración de GSH y con su efecto eliminador sobre la tasa de plomo en tejidos.

OBJETIVO

CAPITULO VIII.- OBJETIVO

En la administración crónica por etanol se han descrito alteraciones en la actividad de algunas enzimas de la ruta biosintética del hemo y una excreción urinaria aumentada de porfirinas. Además, este tóxico induce la síntesis de una hemoproteína específica, el citocromo P450E1, lo que podría multiplicar la hepatotoxicidad de ciertos tóxicos, fármacos y xenobióticos.

El plomo, al contrario que el etanol, parece inhibir la actividad del citocromo P450, hecho éste que sólo ha podido observarse en la intoxicación plúmbica aguda. Por otro lado, es bien conocido el efecto inhibitorio que ejerce este metal sobre la actividad de la enzima ALA-D y sobre otras enzimas de la porfirinosíntesis. Tanto en la intoxicación crónica por plomo como por alcohol, se han publicado dispares resultados en sus efectos sobre la concentración hepática de GSH, tripéptido involucrado en procesos de detoxificación.

Aunque existen trabajos que estudian la intoxicación conjunta de ambos xenobióticos, hemos estimado que el modelo experimental seguido no es el correcto. Por ello, el OBJETIVO de la presente tesis fue estudiar el efecto que el alcohol y el plomo podrían ejercer sobre la síntesis del hemo bajo la hipótesis de que ambos tóxicos actúan sinérgicamente.

El SAMe es un compuesto fisiológico que participa en reacciones de transmetilación y transulfuración, siendo un precursor hepático del GSH. Nos propusimos estudiar su utilidad en la intoxicación experimental por los citados tóxicos, ya que han sido constatados sus efectos beneficiosos tanto en el alcoholismo como en el saturnismo crónico.

MATERIAL Y METODOS

CAPITULO IX.- MATERIAL

Animales de experimentación

Se han utilizado 90 ratas Wistar macho de pesos comprendidos entre 150 y 225 g, criadas en el servicio de Medicina Experimental del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Todos los animales se mantuvieron en dicho servicio bajo las mismas condiciones ambientales de luz y ventilación.

Vías y dosis de intoxicación

Han sido numerosos los intentos realizados por los científicos para reproducir en la rata la patología hepática observada en la intoxicación alcohólica crónica. Estos animales de experimentación, muy utilizados en investigación debido a su fácil manejo y bajo coste, presentan una natural aversión al alcohol, una mayor tasa de metabolización de este tóxico y una mayor tolerancia a sus efectos a altas concentraciones que el observado en humanos. Los clásicos intentos de intoxicación alcohólica experimental a través del agua de bebida no han conseguido elevar la cantidad de etanol consumida más allá del 18% del total del aporte calórico ingerido por la rata, cantidad ésta muy inferior a la observada en el alcoholismo humano (Lieber y cols. 1989).

La utilización de dietas líquidas alcohólicas como la llamada dieta de Lieber-DeCarli asegura un consumo de alcohol (aproximadamente 18g de etanol/Kg/día) entre 2 y 3 veces mayor que el obtenido en la intoxicación en el agua de bebida. Esta dieta fue diseñada en respuesta a la necesidad de desarrollar un modelo experimental de intoxicación alcohólica crónica que mantuviera un control de los nutrientes ingeridos por la rata. La dieta alcohólica contiene un 36% de las calorías totales en forma de etanol, mientras que en la dieta control el alcohol se reemplaza isocalóricamente por carbohidratos (Figura 16). Tanto en la dieta control como en la alcohólica, el aporte de

nutrientes es adecuado, consumiendo la rata un mínimo de aporte calórico de 400 Kcal/Kg/día.

En los escasos estudios llevados a cabo hasta el momento para analizar el metabolismo del hemo tras la administración prolongada de dietas líquidas alcohólicas, el tiempo de intoxicación varió entre 5 y 8 semanas (Teschke y cols. 1987; Okuno y cols. 1989). En nuestro trabajo, nos hemos inclinado por utilizar una intoxicación crónica de 8 semanas, puesto que se adecuaba mejor a la intoxicación por plomo que pretendíamos efectuar simultáneamente en algunos grupos de animales.

El etanol se introdujo progresivamente en la dieta hasta alcanzar su máxima concentración (5 % v/v) a los cinco días de intoxicación. Para la administración de las dietas líquidas control y alcohólica, se utilizaron comederos de cristal Panlab que evitan la evaporación del etanol.

El plomo fue administrado a la rata en forma de acetato de plomo y fue incluido en la dieta líquida en una concentración de 160 mg/L durante el periodo de intoxicación (8 semanas). La ingesta de plomo calculada en los grupos intoxicados por este metal fue de 7.8 mg Pb/rata/día. El objetivo que se pretendió fue el de alcanzar una intoxicación subclínica que mostrara, sin embargo, efectos sobre sensibles parámetros bioquímicos como la actividad de la ALA-D globular.

El SAME se utilizó en la terapia de las intoxicaciones alcohólica y saturnina. Los grupos tratados recibieron dosis de este fármaco de 20 mg/Kg/día subcutáneamente de lunes a viernes durante las 8 semanas que duró la intoxicación.

El estudio de la toxicidad por alcohol y/o plomo y el posterior tratamiento con SAME se estructuró en cuatro experimentos distintos en los que se definieron los grupos de tratamiento citados a continuación.

Experimento 1: En este experimento se analizó el posible efecto sinérgico de las intoxicaciones por plomo y etanol sobre la síntesis del hemo.

- * Grupo I- Control (n=15, Dieta líquida control)
- * Grupo II- Alcohol (n=11, Dieta líquida alcohólica)
- * Grupo III- Plomo (n=10, Dieta líquida control + Plomo)
- * Grupo IV- Alcohol + Plomo (n=11, Dieta líquida alcohólica + plomo)

Experimento 2: En este experimento se analizó el efecto del SAME sobre las alteraciones inducidas por el alcohol en la síntesis del hemo.

- * Grupo I- Control (Dieta control)
- * Grupo II- SAME (n=11, Dieta control + SAME)
- * Grupo III- Alcohol (Dieta alcohólica)
- * Grupo IV- Alcohol + SAME (n=11, Dieta alcohólica + SAME)

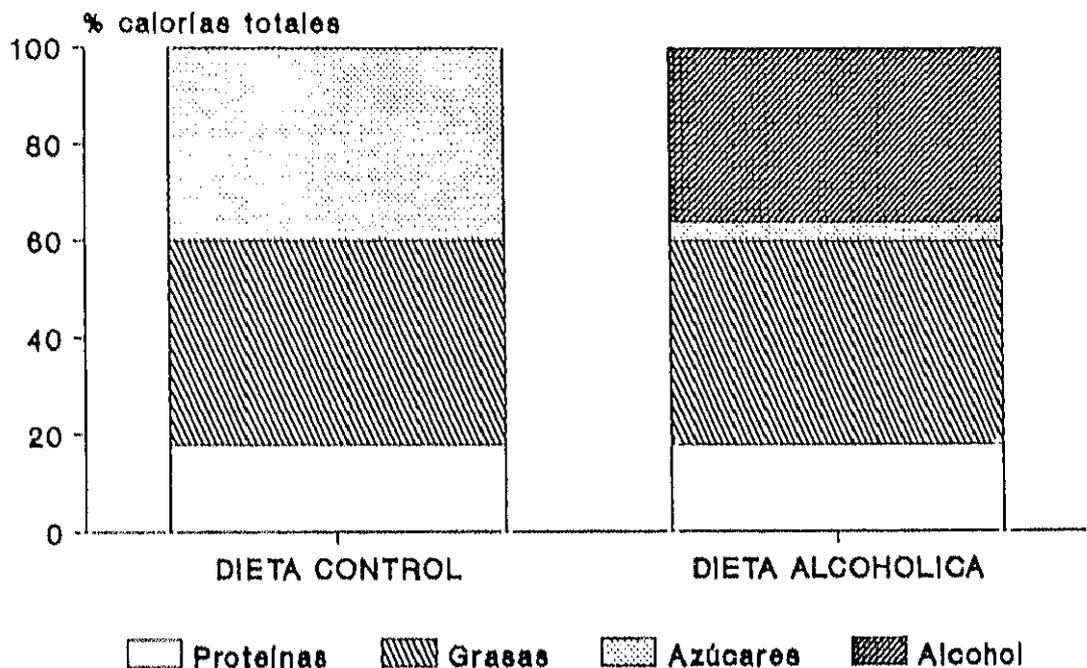
Experimento 3: En esta experimento se analizó el efecto del SAME sobre las alteraciones inducidas por el plomo en la síntesis del hemo.

- * Grupo I- Control (Dieta control)
- * Grupo II- SAME (Dieta control + SAME)
- * Grupo III- Plomo (Dieta alcohólica)
- * Grupo IV- Plomo + SAME (n=11, Dieta control + plomo + SAME)

Experimento 4: En este experimento se analizó el efecto del SAME sobre las alteraciones inducidas por la intoxicación conjunta por plomo y etanol.

- * Grupo I- Control (Dieta control)
- * Grupo II- SAME (Dieta control + SAME)
- * Grupo III- Alcohol + Plomo (Dieta alcohólica + Plomo)
- * Grupo IV- Alcohol + Plomo + SAME (n=10, Dieta alcohólica + Plomo + SAME)

Figura 16.- Dietas líquidas control y alcohólica



Instrumental y reactivos

Instrumental

La detección espectrofotométrica se llevó a cabo en un espectrofotómetro U-3200 Hitachi mientras que las medidas fluorimétricas se realizaron en el fluorímetro F-4010 Hitachi. Se utilizó una ultracentrífuga Beckman LB-70 y otra centrífuga refrigerada Centrikon H-401 Kontron Hermle. La concentración de metales se constató mediante el uso de los equipos espectrofotométricos de absorción atómica Perkin-Elmer 1100 y 5000.

Reactivos

Los Patrones de URO, COPRO y PROTO y los precursores porfirínicos ALA y PBG se obtuvieron de Porphyrin Products (Logan, Utah). El Patrón de GSH se adquirió en los laboratorios Merck.

El acetato de plomo procedía de los laboratorios Aldrich, y el SAME fue generosamente cedido por los laboratorios Europharma. Las dietas líquidas control y alcohólica fueron obtenidas de los laboratorios Panlab. Todos los reactivos utilizados en el laboratorio eran de grado analítico.

CAPITULO X.- METODOS

Recogida de muestras

Las muestras de orina de 24 horas se obtuvieron seriadamente durante el periodo de intoxicación mediante el uso de jaulas metabólicas. Las orinas fueron congeladas a -20° C hasta su posterior procesamiento analítico.

Tras completar las 8 semanas que comprendían el periodo de intoxicación, los animales de experimentación fueron sacrificados anotándose el peso final de la rata y el peso del hígado para el cálculo posterior de la razón peso-hígado/peso-rata. Este índice nos permitirá valorar la posible hepatomegalia inducida por la intoxicación etílica.

Al igual que en otros trabajos sobre las alteraciones de la porfirinosíntesis (Bonkovsky y cols. 1983), los animales se mantuvieron en ayuno 18 horas antes del sacrificio. En una reciente comunicación, Adjarov y cols (1993) han comunicado que tras un ayuno muy superior al utilizado en nuestro estudio (3 días) la actividad de la enzima ALA-D eritrocitaria de ratas Wistar hembra no se modificaba y sí lo hacía su actividad hepática debido a la influencia que este ayuno tan prolongado tiene sobre el metabolismo del hígado. El corto ayuno al que sometimos a las ratas induce la actividad hepática de la enzima ALA-S, permitiendo una medida más exacta de su actividad (Marver y cols. 1966).

Los animales se anestesiaron en campana de cristal con éter etílico y la sangre se extrajo por punción cardiaca y se recogió en viales heparinizados. El hígado y riñón fueron rápidamente extraídos y lavados en solución fría de NaCl 0.9%, y mantenidos en hielo para su inmediata homogeneización y posterior tratamiento analítico. Una pequeña parte del hígado se conservó a -80° C para la determinación del contenido hepático de GSH.

Métodos analíticos

Determinación de porfirinas en orina

La cuantificación de la porfirinuria se hizo en muestras de orina de 24 horas para evitar las presuntas variaciones circadianas de la excreción de porfirinas (Sanguinetti y cols. 1978). Se utilizó un micrométodo fluorimétrico basado en la oxidación de los porfirinógenos con una solución iodada, dilución de las porfirinas en HCl 3N y posterior decoloración con tiosulfato sódico $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05 mM (Westerlund y cols. 1988). La valoración de las muestras se hizo frente a un patrón de COPRO en tiosulfato sódico. Las longitudes de onda de excitación y de emisión empleadas fueron 405 y 650 nm, respectivamente.

Los máximos de excitación de las dos porfirinas presentes en la orina, COPRO y URO, se sitúan en 404 nm y 408 nm respectivamente. La determinación de este máximo se realizó mediante un espectro de excitación de la muestra desde 380 nm hasta 440 nm, fijando la emisión a 650 nm. Al calcular la primera derivada, obtuvimos el punto máximo de excitación que permitió determinar el porcentaje de las dos porfirinas presentes en la muestra de orina.

La gran variabilidad en la diuresis y en la excreción de porfirinas en la rata (Bowers y cols. 1992) requirió corregir las diferencias de concentración de las muestras de orina mediante la medición de la tasa de creatinina. El método utilizado fue el descrito por Jaffé y revisado por Blass y cols. en 1974.

La concentración de porfirinas en orina se expresa como:
 μg de porfirina/ mg de creatinina

Determinación de porfirinas en hematíes

La tasa de protoporfirina eritrocitaria (PPE) se calculó aplicando un método extractivo (Poh-Fitzpatrick y cols. 1974).

Las porfirinas son extraídas con acetato de etilo:ácido acético (7:2) y posteriormente con HCl 1.5 N. La valoración de las porfirinas eritrocitarias se hace frente a un patrón de COPRO en HCl 1.5 N, leyendo la fluorescencia obtenida a las longitudes de onda de 405-595 nm (emisión-excitación). La utilización de un patrón de COPRO en vez de PROTO se debe a la mayor estabilidad de aquella, aunque requiere un factor de corrección de 5.277 para la valoración de PROTO eritrocitaria.

La protoporfirina eritrocitaria, ligada o no con el zinc, se extrae del hematíe con etanol al 95%. Una vez centrifugada esta solución, se realiza un barrido fluorimétrico de emisión entre 550 y 700 nm, fijando la excitación en 415 nm, máximo de excitación de la Zn-PROTO (Hart y Piomelli 1981). Este espectro de emisión permite identificar y evaluar la presencia en hematíes de la PROTO libre y de la forma quelada con zinc, la Zn-PROTO, cuyas longitudes de onda de emisión son 636 y 589 nm respectivamente.

La tasa de protoporfirina eritrocitaria se expresa como:
µg de PROTO/Dl de hematíes

Determinación de porfirinas en tejidos

La extracción de las porfirinas del sobrenadante postmitocondrial de hígado y de riñón se realizó mediante una mezcla de metanol:ácido perclórico 1M (1:1) (Grandchamp y cols. 1980).

La valoración de porfirinas se realizó observando la fluorescencia de patrones de COPRO, URO y PROTO con haces de luz de emisión y excitación de 402-595 nm (COPRO), 406-595 (URO) y 410-605 (PROTO). La cuantificación de las porfirinas tisulares se resolvió mediante un sistema de 3 ecuaciones con 3 incógnitas que son precisamente las fracciones de porfirina a determinar en hígado y riñón.

La concentración de porfirinas en tejidos se expresa como:
µg de COPRO, URO o PROTO/g de tejido fresco

Determinación de ALA y PBG en orina

La separación y determinación de los precursores porfirínicos ALA y PBG se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico según el método de Mauzerall y Granick (1956). Se utilizaron resinas de intercambio catiónico equilibradas en HCl 10 mM para la separación de ALA, y resinas de intercambio aniónico suspendidas en ácido acético 60 mM para el PBG.

La medición de la concentración urinaria de ALA y PBG se realiza espectrofotométricamente al valorar la absorbancia obtenida al iluminar con luz de 553 nm el compuesto formado por el reactivo de Ehrlich y el eluido del PBG. Para la determinación del ALA, este precursor debe ser previamente ciclado a PBG mediante la adición de acetilacetona con calentamiento a 90° C.

El reactivo de Ehrlich, utilizado en la medición de ALA o PBG, está formado por ácido acético (CH₃COOH), ácido perclórico (HClO₄) y p-dimetilaminobenzaldehído (CH₃)₂NC₆H₄CHO.

La concentración de ALA y PBG en orina se expresa como:
µg de ALA o PBG/mg de creatinina

Determinación de la actividad de la ALA-S

La actividad catalítica de esta enzima se midió en hígado y riñón inmediatamente después de extraídas las muestras, debido a la corta vida media de la ALA-S. La homogeneización del tejido se hizo en una proporción de 1:3 con un tampón tris-HCl 0.3 M, añadiendo al medio de incubación EDTA 0.1 M y glicina 2M (Marver y cols 1966).

El producto formado en la catálisis enzimática tras una hora de incubación a 37° C, el ALA, es ciclado a PBG por la acción de

la acetil-acetona tras calentamiento a 90° C durante 10 minutos que permite la reacción con el reactivo de Ehrlich.

La concentración de proteínas se midió según el clásico método de Lowry y cols. (1951). Se preparó una mezcla de carbonato sódico (CO_3Na_2), sulfato de cobre (SO_4Cu), tartrato sódico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$) e hidróxido sódico (NaOH) a la que se añade la fuente enzimática problema. A los 30 minutos, la adición del reactivo de Folin produce una reacción coloreada valorable espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm, extrapolando los valores en una curva patrón preparada con albúmina de suero bovino.

La actividad de la ALA-S hepática y renal se expresa como: nmoles de ALA/mg de proteína·hora

Determinación de la actividad de la ALA-D

El método estandarizado europeo descrito por Berlin y Schaller (1974) ha sido utilizado en nuestro estudio para la medición de la actividad enzimática de esta enzima en sangre y en sobrenadante postmitocondrial de homogeneizados de tejidos. La muestra biológica se incuba con tampón fosfato 0.1 M pH=6.8 que contiene ALA en una concentración de 10 mM durante una hora a 37° C. El producto de esta reacción es el PBG, cuya concentración puede ser medida tras la adición del reactivo de Ehrlich.

El sobrenadante postmitocondrial de hígado y riñón se obtiene homogeneizando una muestra del tejido en CLK 1.15% en proporción de 1:4. El homogeneizado se centrifuga a 12000 g y 4° C durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se utiliza como fuente enzimática para la determinación de la actividad de la ALA-D, PBG-D y para la determinación de porfirinas y proteínas en tejidos.

La actividad de la ALA-D no se expresa totalmente en el organismo por ser una enzima muy sensible a la acción de xenobióticos. *In vitro*, la actividad máxima de esta enzima puede

ser evaluada por la adición al medio de incubación de zinc y de compuestos donadores de grupos tiólicos como el ditioneitol (DTT) ($C_4H_{10}O_2S_2$), que permiten la expresión plena de la actividad catalítica de la ALA-D (Sassa y cols. 1975). Esta medida, a la que nos referiremos como "ALA-D activada" nos da una idea de la cantidad de enzima presente en el ensayo, y es importante su determinación en procesos en los que estén alterados los mecanismos de síntesis de la enzima (Fujita y cols. 1981).

En el caso de la ALA-D, la expresión de su actividad se realiza bien por tasa de sustrato consumido o bien por producto formado a lo largo del tiempo, según se determine su actividad en sangre o tejidos.

La actividad de la ALA-D y ALA-D activada se expresa como:
nmoles de PBG/mg de proteína·minuto (tejidos).
nmoles de ALA/mL de hematíe·minuto (sangre).

Determinación de la actividad de la PBG-D

La actividad de esta enzima se valoró según la técnica de Anderson y Desnick (1982) en sangre y en sobrenadante postmitocondrial de homogeneizados tisulares. El medio de incubación contiene además de la fuente enzimática, un tampón fosfato 1mM pH=7.6, DTT, cloruro de mercurio ($HgCl_2$) y el detergente tritón X-100. El sustrato se añade en un tampón Tris-HCl 0.1 M pH=8.1 y la mezcla se incuba durante una hora a 37° C. El producto de la enzima, El UROgeno, es oxidado a URO por la exposición con luz ultravioleta de longitud de onda de 360 nm. La medición de la concentración de esta porfirina se realiza frente a un patrón de COPRO en HCl 1.5 N midiendo la fluorescencia a las longitudes de onda de excitación y de emisión de 405 y 595 nm respectivamente. La utilización de un patrón de COPRO en vez de URO, se debe a la gran inestabilidad de la URO, sin que se requiera ningún factor de corrección.

La actividad de la PBG-D se expresa como:
nmoles de URO/mg de proteína·hora (tejidos)
nmoles de URO/mL de hematíe·hora (sangre)

Determinación de metales

Una pequeña fracción de hígado o riñón se liofilizó y se solubilizó mediante ataque con NO_3H . La posterior lectura por absorción atómica del contenido tisular de los metales esenciales hierro, cobre o zinc fue llevada a cabo con atomización convencional de llama a las longitudes de onda respectivas de 248.3 nm, 324.8 nm, 213.9 nm (Arroyo y cols. 1988). En la medida de los niveles de plomo por absorción atómica a 283.3 nm en sangre y tejidos se empleó un equipo con un sistema de atomización de horno de grafito que permite una mayor sensibilidad en la medida (Arroyo y cols. 1989).

Los hematíes fueron lisados con NO_3H para determinar la tasa de plomo en sangre, asumiendo que la concentración de este metal tóxico en el plasma es prácticamente nula (Cartón 1985). De la corrección de esta tasa por el valor del hematocrito, resulta la concentración de plomo sanguínea habitualmente utilizada en la literatura científica.

La concentración de metales en tejidos se expresa como:
 μg metal/g de tejido seco
La plumbemia se expresa como:
 μg de plomo/dL de sangre total

Determinación del GSH hepático

El contenido de GSH en muestras de hígado previamente almacenadas a -80°C se valoró fluorimétricamente mediante el método de Hissin y Hilf (1976). La homogeneización de una muestra de tejido hepático se realizó en HPO_3 y en tampón fosfato sódico 100 mM EDTA 5 mM pH=8. Tras ultracentrifugación a 100.000 g durante 30 minutos a 4°C , se recogió el sobrenadante. El GSH

presente en este sobrenadante se hizo reaccionar con el o-ftalaldehído (OPT) para dar un compuesto que puede ser detectado fluorimétricamente a las longitudes de onda de 350 y 420 nm de excitación y emisión respectivamente. El pH es un factor crucial en la especificidad de la reacción final y debe situarse en un valor de 8.

Todos los métodos analíticos empleados en esta tesis han sido suficientemente contrastados con anterioridad en nuestro laboratorio de la Unidad de Investigación sobre Porfirinas y Porfirias. Sin embargo, el método aquí descrito para la cuantificación del GSH hepático fue expresamente puesto a punto y validado para servir los fines perseguidos en esta tesis. En la figura 17 puede observarse la curva patrón obtenida a partir de cantidades conocidas de GSH disueltas en tampón fosfato sódico EDTA en presencia de OPT. Dentro del rango fisiológico de concentración, el coeficiente de correlación de esta recta fue muy cercano a 1 ($r= 0.9996$) y se mantuvo la linealidad en concentraciones del orden de 8 veces superiores a las mostradas en esta figura.

En la figura 18, se muestran los espectros de excitación y emisión del fluoróforo GSH-OPT. En el primer caso, se fijó la emisión en una longitud de onda de 420 nm y en el espectro de emisión se fijó la excitación en 350 nm.

La concentración hepática de GSH se expresa como:
 $\mu\text{g GSH/g}$ de tejido fresco

Figura 17.- Curva patrón de GSH

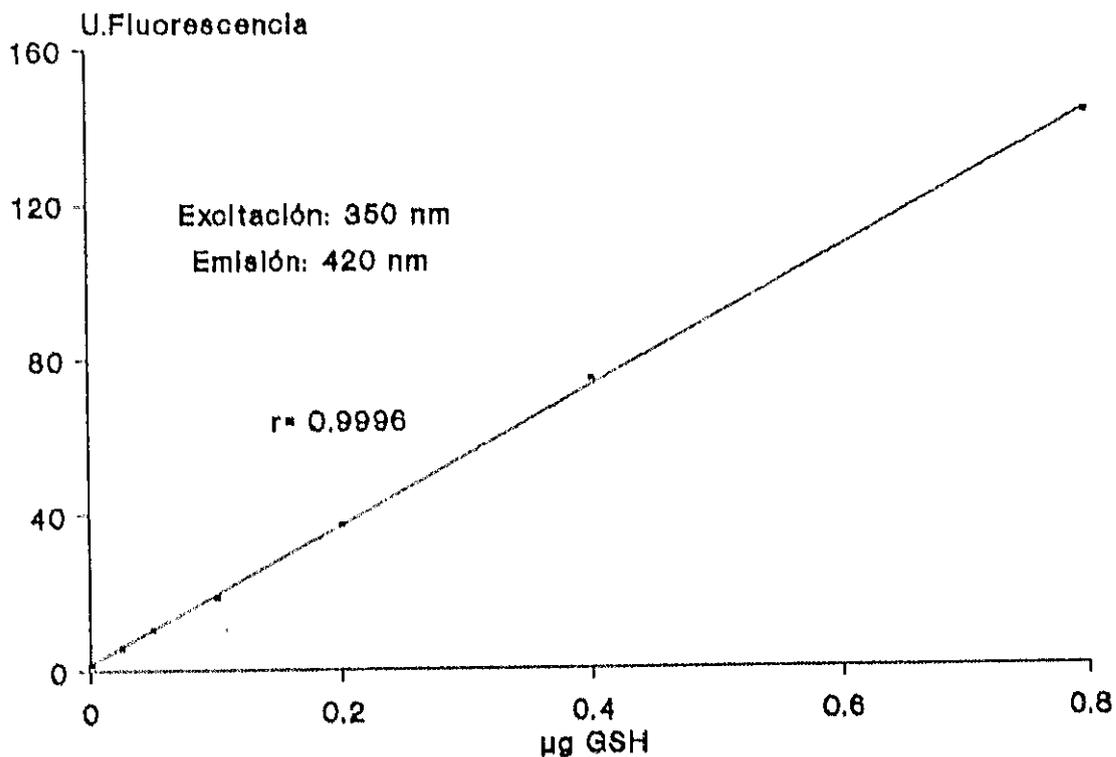
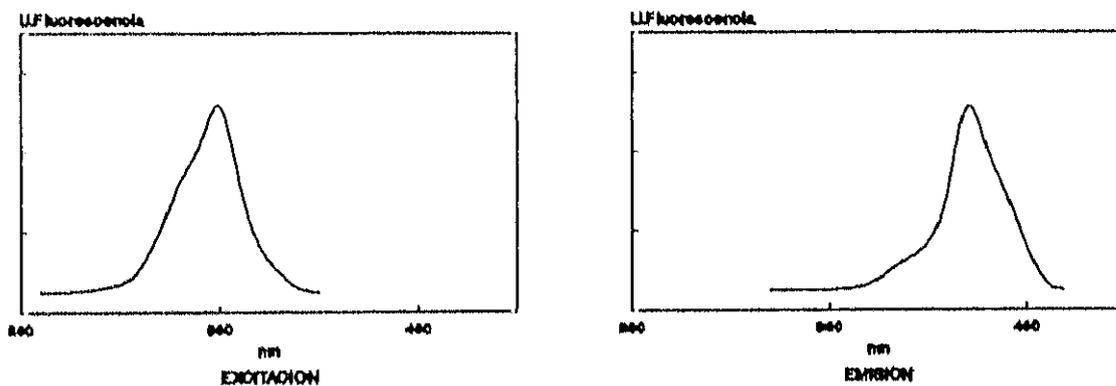


Figura 18.- Espectros de excitación y emisión del complejo GSH-OPT



Métodos estadísticos

Las habituales pruebas estadísticas paramétricas de análisis de la variancia para más de dos grupos requieren la condición de distribución normal de las variables en cada uno de los grupos estudiados (test de Kolmogorov-Smirnov) y de la condición de homogeneidad de variancias (Prueba de Cochran). En nuestro caso, algunas de las variables no siguen la distribución normal, y la mayoría no sigue el criterio de homogeneidad de variancias. Por ello y por el pequeño tamaño de los grupos de animales de experimentación ($n < 30$) hemos decidido utilizar métodos no paramétricos en el análisis estadístico de nuestros datos (Colton 1991).

La prueba no paramétrica equivalente al análisis de la variancia de un factor para comprobar si varios grupos son distintos entre sí, es el llamado test de Kruskal-Wallis. La hipótesis nula de esta prueba plantea la igualdad de medianas entre los grupos estudiados. Si la probabilidad de esta hipótesis tras la realización del test estadístico resulta menor del 5%, se acepta la hipótesis alternativa de desigualdad de variancias. En este caso, es necesario averiguar a qué grupos se debe esta desigualdad para lo cual empleamos el método de comparaciones múltiples para test de Kruskal-Wallis descrito por Sachs en 1984.

Como consecuencia del método estadístico empleado, la medida de centralización utilizada en las figuras mostradas en el capítulo de Discusión ha sido la mediana o percentil 50. Hemos utilizado los percentiles 25 y 75 como medidas de dispersión, teniendo en cuenta que el percentil de orden k corresponde al valor de la variable que deja por debajo el k por ciento de los sujetos de la población. En las tablas recogidas en el capítulo de Resultados, hemos incluido además la media y la desviación estándar, estadísticos más habituales que los anteriormente citados, y que permitirán una mejor comprensión de los datos expuestos en esta tesis.

El grado de asociación entre dos variables se estimó mediante el coeficiente de correlación por rangos de Spearman (r_s), equivalente no paramétrico del coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS

CAPITULO XI.- RESULTADOS

Las tablas 4 a 11 recogen los resultados individuales de todas las determinaciones analíticas mencionadas en el capítulo de métodos. Los 8 grupos de tratamiento son los ya comentados en el capítulo de material, es decir, los formados por un grupo control y todas las combinaciones posibles de los dos tóxicos, plomo y etanol, y el fármaco SAME.

El peso corporal y el peso del hígado de la rata se ha expresado en gramos. El cociente peso hepático/peso corporal se calculó para valorar la posible hepatomegalia descrita en el alcoholismo crónico. El resto de los resultados se han expresado en las unidades descritas en el capítulo de métodos.

Se hizo un seguimiento de la concentración de porfirinas y de sus precursores en orina durante el periodo de intoxicación. La cuantificación de estos compuestos se llevó a cabo en los días de tratamiento 0, 25, 45 y 56.

En las tablas 12 a 19 aparecen las medidas de centralización y dispersión de los diferentes parámetros medidos en cada grupo de tratamiento. Como medidas de centralización se han utilizado la mediana y la media, mientras que las medidas de dispersión han sido la desviación estándar, percentil 25 (P25) y percentil 75 (P75).

TABLA 4.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS CONTROLES

Identificación	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Peso rata	264	255	266	258	253	245
Peso hígado	10.5	10.2	10.8	9.7	9.6	6.4
Peso hígado/Peso rata	0.039	0.04	0.04	0.037	0.037	0.026
Peso riñón	2.5	2.3	2.5	2.2	2.3	2.4
ALA-D sangre	4.85	3.73	2.54	3.81	4.25	6.37
ALA-D activada sangre	7.01	5.68	4.79	6.36	7.08	9.46
PBG-D sangre	21.72	21.76	16.83	20.72	21.72	60.51
PPE	37.68	35.67	47.25	36.96	25.74	59.52
ZPP/PEL	1.94	1.75	1.57	1.9	2.06	
Plumbemia	5.61	8.33	10	10.56	7.5	5.39
ALA-D hígado	0.256	0.236	0.257	0.192	0.254	0.17
ALA-D activada hígado	0.308	0.284	0.324	0.246	0.337	0.16
PBG-D hígado	0.118	0.11	0.115	0.08	0.114	0.169
ALA-S hígado						0.061
GSH hígado						
Pb hígado	1.65	0.36	0.38	1.59	0.54	
Zn hígado	140.5	101.6	97.6	108.5	97.3	137.4
Fe hígado	1181.8	704.1	692.6	743.8	843.2	381.7
Cu hígado	66.1	12.5	11.2	13	8.1	17.55
ALA-D riñón	0.065	0.066	0.073	0.063	0.084	0.043
ALA-D activada riñón	0.092	0.086	0.104	0.095	0.082	0.063
PBG-D riñón	0.065	0.073	0.089	0.087	0.082	0.119
ALA-S riñón						0.1
Pb riñón	3.02	2.54	4.51	3.02	3.5	
Zn riñón	63.4	59.3	65.9	65.1	59.3	84.67
Fe riñón	416.9	394.1	447.9	409.3	460.9	262.1
Cu riñón	21.1	16.9	20.8	20.9	18.9	24.59
Hematocrito	45	49	46	48	44	49
COPRO hígado	0	0	0	0	0	0
URO hígado	0.029	0.035	0.03	0.026	0.034	0.025
PROTO hígado	0.163	0.18	0.19	0.156	0.109	0.46
Porfirinas en hígado	0.192	0.215	0.22	0.182	0.143	0.485
Máximo de excitación (hígado)	411	410.8	412	412.2	411.2	412.2
COPRO riñón	0	0	0	0	0	0
URO riñón	0.144	0.177	0.56	0.44	0.225	0.2
PROTO riñón	0.138	0.13	0.33	0.34	0.41	0.2
Porfirinas en riñón	0.282	0.307	0.89	0.78	0.635	0.4
Máximo de excitación (riñón)	410.2	410.2	410.2	410.8	410.6	408.2
Porfirinas en orina (día 0)	0.2	0.76	0.4	1.15	0.43	0.41
Porfirinas en orina (día 25)	0.56	0.61	0.63	0.8	0.81	0.35
Porfirinas en orina (día 45)	0.4	0.45	0.89	0.99	0.93	0.32
Porfirinas en orina (día 56)	0.79	1.09	0.58	0.34	0.21	0.48
Máximo de excitación (día 0)	404.2	404.2	405.4	404	404.2	404.6
Máximo de excitación (día 25)	407.2	405.2	404.6	405	405	405
Máximo de excitación (día 45)	406.2	405.8	406.4	404.8	404.8	405
Máximo de excitación (día 56)	404.8	404.8	404.4	405	405.2	404.8
ALA en orina (día 0)	3.31	5.16	0.85	0	0.7	0.6
ALA en orina (día 25)	2.29	0.91	2.15	2.58	0.5	2.44
ALA en orina (día 45)	2.12	5.2	0.96	1.54	4.5	1.85
ALA en orina (día 56)	0.94	2.83	1.35	1.54	1.05	2.36
PBG en orina (día 0)	11.22	11.1	12	9.9	5.6	2.8
PBG en orina (día 25)	9.5	6.8	1.5	2.9	2.99	4.1
PBG en orina (día 45)	3.03	4.09	17.3	7.7	4.15	11.1
PBG en orina (día 56)	6.26	2.47	3.45	0	0	5.9

TABLA 4.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS CONTROLES (cont.)

Identificación	C7	C8	C9	C10	C11	C12
Peso rata	215	235	217	239	234	229
Peso hígado	6.6	6.8	6.8	6.2	6.83	6.5
Peso hígado/Peso rata	0.03	0.029	0.031	0.026	0.029	0.028
Peso riñón	2.2	1.8	1.5	1.6	1.6	1.5
ALA-D sangre	5.61	3.56	6.56	6.47	3.84	5.11
ALA-D activada sangre	7.39	4.54	8.59	9.25	7.49	8.59
PBG-D sangre	44.32	40.51	56.12	52.83	17.33	16.4
PPE	50	40.45		47.17	70.06	59.8
ZPP/PEL					1.39	1.36
Plumbemia	1.5	8.1	8.84		4.4	4.4
ALA-D hígado	0.178	0.153	0.154	0.149	0.22	0.244
ALA-D activada hígado	0.22	0.15	0.18	0.183	0.202	0.223
PBG-D hígado	0.21	0.175	0.186	0.173	0.091	0.086
ALA-S hígado	0.053	0.102	0.089	0.026	0.133	0.066
GSH hígado					1761.1	1225.1
Pb hígado					1.01	0.26
Zn hígado	113.5	117.8	116.1	95.74	191	96.37
Fe hígado	305.9	439.3	662.8	436.2	475.38	635.01
Cu hígado	18.61	15	16.4	14.89	15.02	17.99
ALA-D riñón	0.032	0.03	0.038	0.039	0.066	0.067
ALA-D activada riñón	0.042	0.036	0.046	0.044	0.089	0.084
PBG-D riñón	0.107	0.116	0.123	0.137	0.071	0.08
ALA-S riñón	0.107	0.091	0.08	0.15	0.071	0.09
Pb riñón					1.57	0.6
Zn riñón	84.87	86.1	86.42	85.2	63.57	80.12
Fe riñón	291.5	342.8	351.8	269	360.99	265.57
Cu riñón	12.91	34.85	15.43	13.9	31.77	18.31
Hematocrito	50	45	52	45	49	46
COPRO hígado	0	0	0	0	0	0
URO hígado	0.026	0.028	0.025	0.016	0.047	0.055
PROTO hígado	0.18	0.15	0.16	0.11	0.135	0.123
Porfirinas en hígado	0.206	0.178	0.185	0.126	0.182	0.178
Máximo de excitación (hígado)	411.2	410.8	411.4	411.4	411.3	412
COPRO riñón	0	0	0	0	0	0
URO riñón	0.4	0.24	0.6		0.239	0.26
PROTO riñón	0.65	0.29	0.74		0.244	0.22
Porfirinas en riñón	1.05	0.53	1.34		0.483	0.48
Máximo de excitación (riñón)	409.8	409.8	409.6		410.3	410.2
Porfirinas en orina (día 0)	0.42	0.39	0.15	0.94	0.44	0.99
Porfirinas en orina (día 25)	0.82	0.4	0.33	1.34	0.3	0.83
Porfirinas en orina (día 45)	0.43	0.31	0.23	0.81	0.41	0.23
Porfirinas en orina (día 56)	1.5	0.51	0.98	0.2	0.78	0.29
Máximo de excitación (día 0)	404.6	404.6	405	404.4	404.2	404.6
Máximo de excitación (día 25)	404.8	404.8	405.4	404.6	404	404.6
Máximo de excitación (día 45)	404.8	404.8	404.8	404.2	404.4	405.2
Máximo de excitación (día 56)	405	405	405.2	404.2	404.2	404.8
ALA en orina (día 0)	0.2	1	0.33	1.12	0	2
ALA en orina (día 25)	0	12.6	9.3	5.9	0	0
ALA en orina (día 45)	7.9	7	8.1	3.1	1.35	7.21
ALA en orina (día 56)	1.82	1.76	8.26	2.6	6.61	0
PBG en orina (día 0)	1.73	2.1	2.3	1.8	2.7	2.4
PBG en orina (día 25)	5.23	4.2	4.25	3.35	2.7	0.9
PBG en orina (día 45)	10.18	1.18	2.5	0.7	2.3	2.4
PBG en orina (día 56)	9.3	7.4	5.4	4.8	3.5	6.51

TABLA 4.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS CONTROLES (final)

Identificación	C13	C14	C15
Peso rata	228	236	226
Peso hígado	5.98	5.9	6.52
Peso hígado/Peso rata	0.026	0.025	0.028
Peso riñón	1.6	1.7	1.6
ALA-D sangre	2.38	4.6	3.76
ALA-D activada sangre	6.69	9.28	7.31
PBG-D sangre	16.25	17.45	15.44
PPE	60.59	93.3	69
ZPP/PEL	1.53	1.48	1.3
Plumbamia	3.6	3.3	4.7
ALA-D hígado	0.214	0.25	0.184
ALA-D activada hígado	0.259	0.26	0.213
PBG-D hígado	0.11	0.096	0.127
ALA-S hígado	0.14	0.12	0.098
GSH hígado	1899.5	1375.1	1521.4
Pb hígado	0.21	0.2	0.51
Zn hígado	86.42	86.37	72.8
Fe hígado	603.04	387.78	392
Cu hígado	12.77	13.92	11.36
ALA-D riñón	0.064	0.055	0.059
ALA-D activada riñón	0.075	0.064	0.073
PBG-D riñón	0.07	0.063	0.063
ALA-S riñón	0.174	0.23	0.179
Pb riñón	0.59	0.69	0.86
Zn riñón	82.99	77.23	90.04
Fe riñón	381.44	314.14	311.13
Cu riñón	20.62	17.16	21.37
Hematocrito	45	45	45
COPRO hígado	0	0	0
URO hígado	0.043	0.044	0.058
PROTO hígado	0.13	0.129	0.175
Porfirinas en hígado	0.173	0.173	0.233
Máximo de excitación (hígado)	411.6	411.8	411.2
COPRO riñón	0	0	0
URO riñón	0.22	0.59	0.68
PROTO riñón	0.22	0.88	0.43
Porfirinas en riñón	0.44	1.47	1.11
Máximo de excitación (riñón)	410.2	410.4	411
Porfirinas en orina (día 0)	0.48	0.83	0.58
Porfirinas en orina (día 25)	0.6	0.63	0.45
Porfirinas en orina (día 45)	0.5	0.68	0.58
Porfirinas en orina (día 56)	0.63	1.75	0.95
Máximo de excitación (día 0)	404.6	405.8	404.4
Máximo de excitación (día 25)	404.6	404.2	403.6
Máximo de excitación (día 45)	404.2	404.2	404.2
Máximo de excitación (día 56)	404.6	404.4	404.4
ALA en orina (día 0)	0	0.01	0.57
ALA en orina (día 25)	0	0	0
ALA en orina (día 45)	7	2.37	4.37
ALA en orina (día 56)	3.85	2.7	9.13
PBG en orina (día 0)	2.3	4.6	10.2
PBG en orina (día 25)	1.1	3.82	3.3
PBG en orina (día 45)	2.06	2.2	2.54
PBG en orina (día 56)	5.6	4.6	2.3

TABLA 5.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS QUE RECIBIERON SAMe

Identificación	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Peso rata	255	240	251	260	271	253
Peso hígado	7.8	7.1	7.2	7.6	8.6	
Peso hígado/Peso rata	0.03	0.029	0.028	0.029	0.032	0.032
Peso riñón	1.6	1.7	1.4	1.6	1.7	1.4
ALA-D sangre	2.27	1.85	2.05	3.62	1.35	1.81
ALA-D activada sangre	8.89	3.38	6.69	7.14	4.94	3.89
PBG-D sangre	22.56	17.41	19.76	19.84	28.66	22.7
PPE	52.42	50.23	40.36	51.83	23.94	27.1
ZPP/PEL						
Plumbemia			9.24			
ALA-D hígado	0.177	0.162	0.181	0.18	0.167	0.168
ALA-D activada hígado	0.295	0.327	0.312	0.248	0.283	0.232
PBG-D hígado	0.236	0.28	0.269	0.225	0.233	0.217
ALA-S hígado	0.051	0.066	0.125	0.094	0.112	0.048
GSH hígado						
Pb hígado						
Zn hígado	113.3	117.4	84.78	93.12	93.9	86.3
Fe hígado	817.1	515.5	563.6	966.7	816	907.55
Cu hígado	24.8	22.13	17.7	13.96	26.41	14.79
ALA-D riñón	0.022	0.0167	0.025	0.0225	0.0216	0.021
ALA-D activada riñón	0.052	0.047	0.065	0.057	0.056	0.047
PBG-D riñón	0.167	0.154	0.154	0.147	0.124	0.125
ALA-S riñón	0.136	0.06	0.118	0.163	0.103	0.059
Pb riñón						
Zn riñón	91.1	84.9	78.9	99	82.9	86.5
Fe riñón	338.1	400.9	353.4	382.88	344.4	394.4
Cu riñón	23.26	21.69	21.05	17.49	34.85	23.53
Hematocrito	53	49	42	37	49	49
COPRO hígado	0	0	0	0	0	
URO hígado	0.048	0.056	0.032	0.034	0.02	
PROTO hígado	0.116	0.11	0.115	0.168	0.08	
Porfirinas en hígado	0.164	0.166	0.147	0.202	0.1	
Máximo de excitación (hígado)	409.8	410.2	410.6	411	410.4	
COPRO riñón	0	0	0	0	0	0
URO riñón	0.17	0.1	0.37	0.16	0.154	0.128
PROTO hígado	0.28	0.154	0.28	0.21	0.157	0.15
Porfirinas en riñón	0.45	0.254	0.65	0.37	0.311	0.278
Máximo de excitación (riñón)	410.4	410.4	409.2	409.6	409.8	410
Porfirinas en orina (día 0)	1.4	1.8	0.4	0.7	1.5	0.34
Porfirinas en orina (día 25)	0.52	0.45	0.38	0.41	0.59	0.45
Porfirinas en orina (día 45)	0.38	0.27	0.54	0.34	0.4	0.46
Porfirinas en orina (día 56)	0.53	0.52	0.33	0.41	0.56	0.34
Máximo de excitación (día 0)	404.6	404.2	404.6	404.8	404.2	405
Máximo de excitación (día 25)	404.4	404.6	404.8	404.8	404.6	406
Máximo de excitación (día 45)	404.6	405.2	405.2	405.4	404.4	405.2
Máximo de excitación (día 56)	404	404.6	405	404.8	405	404.2
ALA en orina (día 0)	1.75	0.01	0.96	0.01	1.7	1.15
ALA en orina (día 25)	0.49	5.12	0.82	1.92	0.7	0
ALA en orina (día 45)	0.001	0.01	0.01	0.3	0.4	0.84
ALA en orina (día 56)	1.1	0	0.4	0.2	0.01	0.75
PBG en orina (día 0)	3.4	0.14	0.07	0.15	0.3	0.2
PBG en orina (día 25)	1.9	1.5	4.5	10.3	5.3	9.9
PBG en orina (día 45)	3.7	2.1	1.7	4.5	3.3	4.1
PBG en orina (día 56)	3.13	4.4	4.7	3.9	8.3	2.6

TABLA 5.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS QUE RECIBIERON SAME (final)

Identificación	S7	S8	S9	S10	S11
Peso rata	254	233	256	248	242
Peso hígado	6.8	7.29	5.56	7.6	6.35
Peso hígado/Peso rata	0.027	0.031	0.022	0.03	0.026
Peso riñón	1.7	1.78	1.55	1.86	1.6
ALA-D sangre	7.8	7.48	5.98	5.34	2.06
ALA-D activada sangre	10.46	10.6	8.85	8.42	5.38
PBG-D sangre	39.3	45.06	38.78	36.06	25.88
PPE	70.71	56.34	58.35	54.99	55.06
ZPP/PEL	1.43	1.38	1.49	1.5	1.61
Plumbemia	3.4	3.5	4.2	5.51	5.65
ALA-D hígado	0.218	0.142	0.16	0.24	0.164
ALA-D activada hígado	0.261	0.169	0.22	0.188	0.2
PBG-D hígado	0.14	0.123	0.134	0.111	0.129
ALA-S hígado	0.194	0.231	0.122	0.178	0.134
GSH hígado	1530.7	1643.8	1550.5	1309.1	1247.8
Pb hígado	0.64	0.73	0.88	0.45	1.12
Zn hígado	102.16	123.64	109.62	98.83	114.35
Fe hígado	667.07	544.32	492.59	526.48	722.04
Cu hígado	16.35	15	16.23	12.53	15.69
ALA-D riñón	0.052	0.05	0.057	0.052	0.051
ALA-D activada riñón	0.062	0.062	0.067	0.07	0.073
PBG-D riñón	0.105	0.097	0.109	0.11	0.102
ALA-S riñón	0.302	0.496	0.238	0.168	0.145
Pb riñón	0.81	0.61	0.335	0.464	0.764
Zn riñón	86.79	79.32	85.37	91.62	86.23
Fe riñón	375.23	320.51	321.43	304.32	389.56
Cu riñón	31.55	33.33	25.78	35.21	27.76
Hematocrito	48	43	44	44	43
COPRO hígado	0	0	0	0	0
URO hígado	0.07	0.04	0.052	0.074	0.074
PROTO hígado	0.22	0.203	0.16	0.167	0.176
Porfirinas en hígado	0.29	0.243	0.212	0.241	0.25
Máximo de excitación (hígado)	412.2	411.6	411.8	412.6	411.6
COPRO riñón	0	0	0	0	0
URO riñón	0.25	0.21	0.103	0.158	0.21
PROTO hígado	0.26	0.43	0.143	0.167	0.32
Porfirinas en riñón	0.51	0.64	0.246	0.325	0.53
Máximo de excitación (riñón)	410.2	410.6	410.2	410.2	409.6
Porfirinas en orina (día 0)	0.94	1.3	0.25	0.68	0.88
Porfirinas en orina (día 25)	0.46	0.3	0.27	0.29	0.14
Porfirinas en orina (día 45)	0.21	0.28	0.17	0.13	0.27
Porfirinas en orina (día 56)	0.24	0.25	0.33	0.22	0.35
Máximo de excitación (día 0)	405.8	404.2	405	404	403.8
Máximo de excitación (día 25)	403.8	403.6	404	404	404.6
Máximo de excitación (día 45)	404.8	404.4	405	405.2	404.4
Máximo de excitación (día 56)	404.2	404	404.6	404.4	404.2
ALA en orina (día 0)	2.7	0.07	0.24	0.19	0.17
ALA en orina (día 25)	0	0	0.27	0.17	
ALA en orina (día 45)	3.93	0.12	0.46	1.6	0.46
ALA en orina (día 56)	0.7	5.13	11.1	1.05	5.6
PBG en orina (día 0)	4.5	10.3	5.9	6.1	8.3
PBG en orina (día 25)	0	0	0	8.3	3.74
PBG en orina (día 45)	13.7	14.4	1.72	9.9	4.4
PBG en orina (día 56)	2.11	4.3	3.34	1.41	2.8

TABLA 6.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS QUE RECIBIERON ALCOHOL

Identificación	A1	A2	A3	A4	A5	A6
Peso rata	224	208	250	211	215	211
Peso hígado	9.1	8.8	9.03	8.3	8	7
Peso riñón	1.8	2.1	2.32	2.1	2	2.1
ALA-D sangre	2.51	3.57	2.86	3	2.44	2.96
ALA-D activada sangre	8.03	7.99	6.44	8.07	9.89	7.07
PBG-D sangre	43.57	32.87	28.57	43.26	50.14	32.88
PPE	80.84	61.21	62.32	69.49	39.36	59.26
ZPP/PEL						
Plumbemia	13.77	14.04	11.5	5.2		
ALA-D hígado	0.097	0.143	0.17	0.2	0.19	0.21
ALA-D activada hígado	0.192	0.222	0.19	0.22	0.22	0.22
PBG-D hígado	0.14	0.121	0.16	0.2	0.29	0.33
ALA-S hígado						
GSH hígado						
Pb hígado	0.97	0.79	0.62	0.47	0.53	0.43
Zn hígado	87.1	91.5	101.9	91.9	89.6	86
Fe hígado	1104.4	807.3	971.6	763.3	814.1	1077.3
Cu hígado	16.9	13.7	17.73	15.2	14.6	14.2
ALA-D riñón	0.036	0.037	0.054	0.044	0.038	0.042
ALA-D activada riñón	0.056	0.062	0.071	0.058	0.059	0.069
PBG-D riñón	0.191	0.116	0.317	0.113	0.176	0.108
ALA-S riñón						
Pb riñón	3.64	2.89	4.13	3.55	3.55	
Zn riñón	52.4	56.3	56.4	56.5	52.4	68.3
Fe riñón	360.99	347.6	326.1	317.6	359.9	460.4
Cu riñón	18.2	19.3	22.6	17.4	21.9	28.8
Hematocrito	51	52	50	40	38	46
COPRO hígado	0.001	0.007	0.003	0.009	0.003	0
URO hígado	0.011	0.022	0.03	0.027	0.017	0.02
PROTO hígado	0.155	0.065	0.09	0.085	0.097	0.084
Porfirinas en hígado	0.167	0.094	0.123	0.121	0.117	0.104
Máximo de excitación (hígado)	411.6	411.8	410.6	411.4	411.8	412
COPRO riñón	0	0	0	0	0	0
URO riñón	0.34	0.71	0.023	0.17	0.32	0.174
PROTO riñón	0.58	0.55	0.46	0.17	0.42	0.49
Porfirinas en riñón	0.92	1.26	0.483	0.34	0.74	0.664
Máximo de excitación (riñón)	410.6	410.4	410.2	410.6	410.2	410.8
Porfirinas en orina (día 0)	1.17	1.11	0.79	0.25	0.7	0.85
Porfirinas en orina (día 25)	0.54	0.51	0.36	0.14	0.22	0.4
Porfirinas en orina (día 45)	0.43	0.46	0.29	0.1	0.19	0.3
Porfirinas en orina (día 56)	0.32	0.4	0.54	0.66	0.99	0.83
Máximo de excitación (día 0)	404	404.2	404.2	404.8	404.4	404.4
Máximo de excitación (día 25)	404.6	404.6	404.8	405	404.8	404.6
Máximo de excitación (día 45)	404.2	404.2	404.4	405	404.2	404.2
Máximo de excitación (día 56)	404.8	404.8	404.6	405	404.6	404.4
ALA en orina (día 0)	4.62	4.85	3.72	0	4.87	5.38
ALA en orina (día 25)	0.7	0	0	0	0.32	0
ALA en orina (día 45)	0	0.76	2.07	0.68	0.48	0
ALA en orina (día 56)	0.31	1.16	0	1.55	1.9	0.84
PBG en orina (día 0)	5.13	4.11	2.29	3.25	2.79	1.81
PBG en orina (día 25)	7.58	7.24	8.17	0	6.1	6.94
PBG en orina (día 45)	0.89	3.13	2.14	2.2	1.52	2.65
PBG en orina (día 56)	7.54	5.02	2.3	5.26	3.78	5.61

TABLA 6.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS QUE RECIBIERON ALCOHOL (final)

Identificación	A7	A8	A9	A10	A11
Peso rata	216	243	267	265	223
Peso hígado	7.38	7.75	7.62	7.55	6.87
Peso hígado/Peso rata	0.034	0.032	0.028	0.028	0.031
Peso riñón	1.6	1.54	1.84	1.8	1.56
ALA-D sangre	4.1	2.92	4.37	3.8	4
ALA-D activada sangre	8.41	7.16	9.61	8.41	9.41
PBG-D sangre	21.52	28.68	25.87	19.18	18.2
PPE	44.33	64.46	73.52	56.13	67.92
ZPP/PEL	1.26	1.29	1.16	1.26	1.14
Plumbemia	10	11.4	10.08	6.9	5.7
ALA-D hígado	0.127	0.158	0.152	0.157	0.149
ALA-D activada hígado	0.157	0.173	0.166	0.179	0.172
PBG-D hígado	0.107	0.106	0.104	0.11	0.112
ALA-S hígado	0.049	0.079	0.044	0.045	0.103
GSH hígado	1340	1233.8	851.78	1502.6	1385.1
Pb hígado	0.71	1.47	0.49	0.27	0.79
Zn hígado	86.22	87.16	105.88	94.53	95.25
Fe hígado	759.84	566.56	747.17	556.6	839.1
Cu hígado	15.67	14.66	14.8	17.39	16.71
ALA-D riñón	0.04	0.05	0.046	0.047	0.044
ALA-D activada riñón	0.055	0.062	0.061	0.06	0.055
PBG-D riñón	0.074	0.078	0.063	0.075	0.069
ALA-S riñón	0.11	0.088	0.073	0.143	0.087
Pb riñón	1.25	1.98	3.32	1.11	1.31
Zn riñón	78.46	78.49	85.02	82.23	84.66
Fe riñón	427.74	344.68	372.24	335.59	338.64
Cu riñón	25.77	26.08	26.56	32.41	31.87
Hematocrito	47	46	46	47	51
COPRO hígado	0	0	0	0	0
URO hígado	0.034	0.085	0.067	0.054	0.047
PROTO hígado	0.12	0.197	0.143	0.17	0.126
Porfirinas en hígado	0.154	0.282	0.21	0.224	0.173
Máximo de excitación (hígado)	411.6	410.8	411.6	412.4	412.2
COPRO riñón	0	0	0	0	0
URO riñón	0.447	0.72	0.237	0.28	0.58
PROTO riñón	0.37	0.56	0.247	0.25	0.54
Porfirinas en riñón	0.817	1.28	0.484	0.53	1.12
Máximo de excitación (riñón)	410.2	410.2	411.4	410.2	410.4
Porfirinas en orina (día 0)	1.02	0.92	0.42	0.31	1.21
Porfirinas en orina (día 25)	0.43	0.72	0.18	0.21	0.29
Porfirinas en orina (día 45)	0.6	0.23	0.35	0.26	0.26
Porfirinas en orina (día 56)	1.16	0.54	0.49	0.63	0.78
Máximo de excitación (día 0)	404	404	404.4	404.4	404.2
Máximo de excitación (día 25)	404.4	404.2	404.8	404.8	404.4
Máximo de excitación (día 45)	404.2	404.2	404.2	404.6	404.6
Máximo de excitación (día 56)	404	403.6	404.4	405	404
ALA en orina (día 0)	2	2.7	3.3	5.9	13.1
ALA en orina (día 25)	1.9	2.2	2.4	3.6	1.5
ALA en orina (día 45)	3.5	2.2	4.8	0.7	0.9
ALA en orina (día 56)	2.05	0	0.06	0	3.7
PBG en orina (día 0)	2.3	1.9	1.42	1.8	1.7
PBG en orina (día 25)	6.5	14.9	13.6	3.5	9.6
PBG en orina (día 45)	2.04	14.3	3.2	3.47	2.83
PBG en orina (día 56)	5.7	6.8	4.5	5.6	6.3

TABLA 7.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS QUE RECIBIERON ALCOHOL + SAME

Identificación	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5	AS6
Peso rata	253	244	253	258	257	248
Peso hígado	7.8	7.6	7.2	7.8	7.4	7.7
Peso hígado/Peso rata	0.031	0.031	0.028	0.03	0.029	0.031
Peso riñón	1.4	1.6	1.9	1.6	1.4	1.6
ALA-D sangre	1.16	1.95	2.82	2.57	2.46	2.17
ALA-D activada sangre	2.98	3.79	3.74	3.01	3.57	2.82
PBG-D sangre	27.25	31.72	36.77	23.12	34.46	34.65
PPE	27.42	18.69	28.84	31.12	31.92	38.29
ZPP/PEL						
Plumbemia	8.1	6.97	4.92	6.9	7.04	8.3
ALA-D hígado	0.153	0.148	0.179	0.128	0.121	0.144
ALA-D activada hígado	0.216	0.222	0.242	0.18	0.161	0.185
PBG-D hígado	0.248	0.202	0.235	0.211	0.196	0.205
ALA-S hígado	0.04	0.074	0.12	0.123	0.113	0.063
GSH hígado						
Pb hígado						
Zn hígado	90.4	102.48	103.8	108.5	117.3	114.3
Fe hígado	1234.4	925.4	717.8	826.9	1033.7	733.3
Cu hígado	18.36	18.63	20.6	17.3	15.5	32.06
ALA-D riñón	0.04	0.051	0.048	0.04	0.039	0.052
ALA-D activada riñón	0.083	0.087	0.086	0.072	0.069	0.083
PBG-D riñón	0.204	0.204	0.195	0.178	0.201	0.178
ALA-S riñón	0.537	0.318	0.11	0.166	0.541	0.089
Pb riñón						
Zn riñón	88.9	113.3	98.9	84.3	73.3	97.6
Fe riñón	409.2	328.1	406.3	367.4	389.1	381.3
Cu riñón	28.47	32.03	32.5	35.54	40.27	23.25
Hematocrito	45	41	41	46	44	49
COPRO hígado	0	0	0	0.024		
URO hígado	0.023	0.041	0.015	0.02		
PROTO hígado	0.135	0.4	0.52	0.08		
Porfirinas en hígado	0.158	0.441	0.535	0.124		
Máximo de excitación (hígado)	411.4	412.4	412.6	410.6		
COPRO riñón	0	0	0	0	0	0
URO riñón	0.16	0.28	0.2	0.16	0.157	0.196
PROTO riñón	0.19	0.21	0.18	0.12	0.163	0.22
Porfirinas en riñón	0.35	0.49	0.38	0.28	0.32	0.416
Máximo de excitación (riñón)	410.6	408.6	409.6	409	409.8	410
Porfirinas en orina (día 0)	0.69	1.14	0.8	1.95	0.59	0.42
Porfirinas en orina (día 25)	0.75	0.7	0.6	0.55	0.88	0.97
Porfirinas en orina (día 45)	0.95	0.5	0.52	0.82	0.56	0.44
Porfirinas en orina (día 56)	0.63	0.56	0.45		0.52	0.76
Máximo de excitación (día 0)	404.8	404.4	404.8	404.4	404.4	404.8
Máximo de excitación (día 25)	404.4	404.2	404.6	404.2	405.2	404.4
Máximo de excitación (día 45)	405.2	405	405.4	404.8	405.2	405.2
Máximo de excitación (día 56)	404.6	404.2	404.6		404.8	405.2
ALA en orina (día 0)	1.28	0.9	0.94	1	1.6	0.1
ALA en orina (día 25)	4.22	2.27	3.5	2.6	4.3	2.45
ALA en orina (día 45)	0.5	2.1	4.1	0.7	0	0
ALA en orina (día 56)	4	0.75	1.5	4.14	0.94	0
PBG en orina (día 0)	3.21	1.4	3.96	3.97	2.15	0.82
PBG en orina (día 25)	2.9	4.2	1.8	2.02	1.7	2.04
PBG en orina (día 45)	7.8	4.4	6.3	4.5	2.9	0.8
PBG en orina (día 56)	3.5	4.9	7.6	9.6	5.1	2.7

TABLA 7.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS QUE RECIBIERON ALCOHOL + SAMe (final)

Identificación	AS7	AS8	AS9	AS10	AS11
Peso rata	267	256	248	266	240
Peso hígado	7.35	8.05	6.84	7.73	7.35
Peso hígado/Peso rata	0.027	0.031	0.027	0.029	0.03
Peso riñón	1.67	1.86	1.6	1.71	1.55
ALA-D sangre	5.85	5.2	6.3	5.42	4.2
ALA-D activada sangre	11.76	8.71	8.83	8.1	9.23
PBG-D sangre	26.92	29.65	31.11	26.25	27.24
PPE	57.22	62.86	59.51	62.28	63.58
ZPP/PEL	1.08	1.06	1.15	1.12	1.06
Plumbemia	4.1	4.1	4.6	4.3	5.1
ALA-D hígado	0.187	0.204	0.212	0.212	0.166
ALA-D activada hígado	0.19	0.197	0.205	0.207	0.181
PBG-D hígado	0.102	0.118	0.132	0.141	0.101
ALA-S hígado	0.076	0.15	0.062	0.15	0.049
GSH hígado	1604	1127.9	1290.9	1287.9	1624.3
Pb hígado	0.24	0.53	0.45	0.93	0.5
Zn hígado	82.25	94.64	95.61	97.66	92.03
Fe hígado	750	413.84	421.1	617.32	518.54
Cu hígado	14.59	13.02	16.09	21.02	16.09
ALA-D riñón	0.072	0.08	0.069	0.069	0.064
ALA-D activada riñón	0.075	0.086	0.069	0.071	0.066
PBG-D riñón	0.085	0.099	0.086	0.085	0.1
ALA-S riñón	0.055	0.15	0.13	0.116	0.108
Pb riñón	0.56	0.398	0.44	0.359	2.06
Zn riñón	78.06	91.03	79.1	83.53	83.1
Fe riñón	322.37	266.3	352.2	336.43	367.75
Cu riñón	28.57	24.94	28.52	31.9	28.85
Hematocrito	44	45	45	43	39
COPRO hígado	0	0	0	0	0
URO hígado	0.026	0.03	0.065	0.066	0.077
PROTO hígado	0.166	0.23	0.19	0.18	0.18
Porfirinas en hígado	0.192	0.26	0.255	0.246	0.257
Máximo de excitación (hígado)	411.6	411.8	411.4	411.2	411.6
COPRO riñón	0	0	0	0	0
URO riñón	0.19	0.146	0.085	0.18	0.25
PROTO riñón	0.19	0.3	0.19	0.183	0.2
Porfirinas en riñón	0.38	0.446	0.275	0.363	0.45
Máximo de excitación (riñón)	409.8	410.6	410.2	410.6	410.6
Porfirinas en orina (día 0)	1.56	0.71	0.14	0.21	0.4
Porfirinas en orina (día 25)	0.17	0.3	0.14	0.26	0.2
Porfirinas en orina (día 45)	0.29	0.35	0.21	0.2	0.34
Porfirinas en orina (día 56)	0.48	0.53	0.25	0.33	0.26
Máximo de excitación (día 0)	404.8	404.4	403.6	404.6	403.8
Máximo de excitación (día 25)	404.8	404	404.6	404.6	405.2
Máximo de excitación (día 45)	404.2	403.8	404.2	404.4	403.8
Máximo de excitación (día 56)	403.8	403.6	404	404	403.8
ALA en orina (día 0)	0	0	0.9	0	0
ALA en orina (día 25)	0.5	1.3	1.5	1.5	0
ALA en orina (día 45)	0	1.6	0.4	0.4	0.08
ALA en orina (día 56)	1.1	0.9	0.3	1.3	0
PBG en orina (día 0)	0	0	0	0	0
PBG en orina (día 25)	0	1.1	0.8	2.6	0.71
PBG en orina (día 45)	5.7	2	1.3	1.1	1.2
PBG en orina (día 56)	4.4	3.2	4.4	6	5.5

TABLA 8.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS QUE RECIBIERON PLOMO

Identificación	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Peso rata	273	253	260	251	250	290
Peso hígado	9.6	10	9.6	8.3	8.6	7.63
Peso hígado/Peso rata	0.035	0.039	0.037	0.033	0.034	0.026
Peso riñón	2.2	2.5	2.2	2.3	2	1.83
ALA-D sangre	0.23	0.15	0.2	0.073	0.15	0.68
ALA-D activada sangre	16.16	7.89	7.8	10.16	8.48	12.4
PBG-D sangre	20.74	15.39	18.19	14.23	18.48	40.96
PPE	137.15	88.39	91.66	86.75	91.55	182.34
ZPP/PEL	1.43	1.74	1.61	1.48	1.54	1.57
Plumbemia	108.68	98.49	79.65	66.5	74.48	106.7
ALA-D hígado	0.13	0.18	0.15	0.25	0.13	0.129
ALA-D activada hígado	0.19	0.38	0.31	0.5	0.25	0.22
PBG-D hígado	0.074	0.15	0.14	0.16	0.081	0.137
ALA-S hígado						0.218
GSH hígado						1124.3
Pb hígado	5.26	4.3	6.67	4.05	4.01	3.46
Zn hígado	94.9	93	107.7	67.9	87.3	115.35
Fe hígado	1321.1	947.1	923.1	702.1	667.7	759.84
Cu hígado	13.7	12.7	5.1	10.9	9.6	19.05
ALA-D riñón	0.105	0.067	0.076	0.073	0.05	0.035
ALA-D activada riñón	0.175	0.116	0.151	0.145	0.073	0.088
PBG-D riñón	0.143	0.087	0.123	0.097	0.093	0.096
ALA-S riñón						0.194
Pb riñón	67.42	40.65	43.14	56.64	49.89	25.16
Zn riñón	60.2	59.4	63.2	65.2	59.9	73.43
Fe riñón	453.6	437	301.4	401	425.7	292.97
Cu riñón	15	18	14.4	20.6	15.5	25.86
Hematocrito	52	49	45	50	49	44
COPRO hígado	0	0	0	0	0	0
URO hígado	0.02	0.016	0.022	0.025	0.013	0.041
PROTO hígado	0.11	0.105	0.12	0.11	0.102	0.199
Porfirinas en hígado	0.13	0.121	0.142	0.135	0.115	0.24
Máximo de excitación (hígado)	412.2	412.2	412.4	411.6	412.4	411.6
COPRO riñón	0	0	0	0	0	0
URO riñón	0.24	0.34	0.32	0.39	0.31	0.19
PROTO riñón	0.44	0.45	0.33	0.35	0.45	0.44
Porfirinas en riñón	0.68	0.79	0.65	0.74	0.76	0.63
Máximo de excitación (riñón)	410.4	409.8	410.8	410.2	410.6	411
Porfirinas en orina (día 0)	0.93	0.3	3.3	0.5	0.55	0.94
Porfirinas en orina (día 25)	0.38	1.06	1.5	1.05	0.7	0.76
Porfirinas en orina (día 45)	0.69	0.59	0.85	0.9	1.15	0.55
Porfirinas en orina (día 56)	0.9	0.89	0.77	1.03	0.62	1.14
Máximo de excitación (día 0)	403.8	405	404.2	404.6	404.2	403.8
Máximo de excitación (día 25)	404.6	404.8	404.4	404.8	404.8	404
Máximo de excitación (día 45)	404.8	404.6	404.4	404.6	404.6	403.8
Máximo de excitación (día 56)	404.8	405	404.8	404.8	404.4	403.8
ALA en orina (día 0)	2.5	8.9	12.6	1.2	2.2	0.7
ALA en orina (día 25)	4.23	4.5	5.6	2.4	2.9	0.25
ALA en orina (día 45)	0	0.8	2.2	0.1	1.7	4.9
ALA en orina (día 56)	0.32	4.3	4.3	2.4	2.65	1.5
PBG en orina (día 0)	6.2	4.3	19	4.4	9.6	4.4
PBG en orina (día 25)	1.41	3.4	1.5	0	1.63	6.4
PBG en orina (día 45)	3.2	1.3	8.3	4.5	8.5	3.9
PBG en orina (día 56)	2.9	3.7	6.9	1.6	3.97	1.7

TABLA 8.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS QUE RECIBIERON PLOMO (final)

Identificación	P7	P8	P9	P10
Peso rata	247	261	263	262
Peso hígado	6.01	7.46	7.23	6.37
Peso hígado/Peso rata	0.024	0.028	0.027	0.024
Peso riñón	1.58	1.75	1.78	1.65
ALA-D sangre	0.65	2.39	1.95	1.12
ALA-D activada sangre	13.57	16.12	13.76	11.04
PBG-D sangre	43.91	45.25	39.45	37.3
PPE	143.26	92.19	101.21	138.27
ZPP/PEL	1.65	1.58	1.49	1.56
Plumbemia	51.4	46.8	85.7	120.1
ALA-D hígado	0.147	0.147	0.154	0.172
ALA-D activada hígado	0.182	0.191	0.194	0.225
PBG-D hígado	0.124	0.117	0.123	0.131
ALA-S hígado	0.168	0.354	0.196	0.294
GSH hígado	1607.8	1266.2	1200.1	1619.4
Pb hígado	2.18	2.82	2.32	2.68
Zn hígado	110.13	137.69	115.1	98.35
Fe hígado	568.63	695.77	698.7	622.14
Cu hígado	15.81	18	22.13	16.65
ALA-D riñón	0.046	0.059	0.042	0.05
ALA-D activada riñón	0.104	0.118	0.086	0.108
PBG-D riñón	0.096	0.12	0.093	0.114
ALA-S riñón	0.283	0.231	0.22	0.249
Pb riñón	23.26	13.28	24.01	26.3
Zn riñón	80.37	79.03	80.44	80.98
Fe riñón	188.88	329.63	285.98	292.25
Cu riñón	24.07	19.37	19.74	20.35
Hematocrito	42	42	41	46
COPRO hígado	0	0	0	0
URO hígado	0.059	0.057	0.055	0.73
PROTO hígado	0.23	0.31	0.17	0.16
Porfirinas en hígado	0.289	0.367	0.225	0.89
Máximo de excitación (hígado)	410.4	411.4	410.4	411.4
COPRO riñón	0	0	0	0
URO riñón	0.32	0.1	0.66	0.58
PROTO riñón	0.3	0.4	0.48	0.39
Porfirinas en riñón	0.62	0.5	1.14	0.97
Máximo de excitación (riñón)	410.4	411	410.2	409.8
Porfirinas en orina (día 0)	0.81	0.21	0.82	0.97
Porfirinas en orina (día 25)	0.73	0.4	0.85	0.39
Porfirinas en orina (día 45)	0.85	0.45	0.83	0.4
Porfirinas en orina (día 56)	0.72	0.62	0.91	0.75
Máximo de excitación (día 0)	404.2	404.8	403.8	404
Máximo de excitación (día 25)	404	404	404	404
Máximo de excitación (día 45)	403.8	404	403.8	404
Máximo de excitación (día 56)	403.8	404	403.8	404
ALA en orina (día 0)	0.7	1	0.6	1.1
ALA en orina (día 25)	1	1.8	4.2	3.3
ALA en orina (día 45)	1.8	3.6	2.5	6
ALA en orina (día 56)	1.9	1.8	0.98	0
PBG en orina (día 0)	10.2	4.3	6.6	2.8
PBG en orina (día 25)	3.3	1.2	1.3	0.3
PBG en orina (día 45)	3.5	5.3	3.2	3.1
PBG en orina (día 56)	2.4	3.8	0.4	2.8

TABLA 9.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS QUE RECIBIERON PLOMO + SAME

Identificación	PS1	PS2	PS3	PS4	PS5	PS6
Peso rata	213	247	266	227	263	245
Peso hígado	5.2	7	7.1	7.2	7.8	6.8
Peso hígado/Peso rata	0.024	0.028	0.027	0.032	0.029	0.0277
Peso riñón	1.4	1.8	1.7	1.8	1.8	1.8
ALA-D sangre	0.904	0.987	0.78	0.817	0.806	1102
ALA-D activada sangre	24.84	26.38	19.26	17.42	16.18	22.17
PBG-D sangre	57.75	72.22	51.52	55.39	58.42	50.9
PPE	91.46	68.02	85.34	100.33	66.41	93.4
ZPP/PEL						
Plumbemia						
ALA-D hígado	0.17	0.233	0.171	0.115	0.139	0.146
ALA-D activada hígado	0.217	0.304	0.223	0.154	0.191	0.209
PBG-D hígado	0.263	0.106	0.304	0.224	0.265	0.146
ALA-S hígado		0.044	0.018		0.027	0.15
GSH hígado						
Pb hígado						
Zn hígado	120.8	144.2	119.3	120.2	95.7	125.2
Fe hígado	419.46	772.1	556.1	639.3	861.9	566
Cu hígado	22.81	18.14	20.52	22.58	17.18	21.44
ALA-D riñón	0.031	0.029	0.025	0.027	0.02	0.03
ALA-D activada riñón	0.083	0.075	0.08	0.065	0.066	0.074
PBG-D riñón	0.225	0.235	0.23	0.2033	0.23	0.22
ALA-S riñón	0.072	0.064	0.22		0.11	0.02
Pb riñón	39.29	33.3	59.63	38.63	35.63	34.65
Zn riñón	78.6	80.8	143.9	86.64	90.03	95.2
Fe riñón	281.8	289.2	273.1	285.2	295.8	291
Cu riñón	20.32	27.69	38.04	26.35	33.76	29.36
Hematocrito	46	50	48	51	46	49
COPRO hígado	0	0	0	0	0	0
URO hígado	0.037	0.03	0.032	0.02	0.01	0.03
PROTO hígado	0.151	0.152	0.21	0.143	0.16	0.23
Porfirinas en hígado	0.188	0.182	0.242	0.163	0.17	0.26
Máximo de excitación (hígado)	410.6	411	411.2	413	413.6	411.8
COPRO riñón	0	0	0	0	0	0
URO riñón	0.44	0.51	0.41	0.34	0.32	0.34
PROTO riñón	0.39	0.44	0.34	0.23	0.29	0.35
Porfirinas en riñón	0.83	0.95	0.75	0.57	0.61	0.69
Máximo de excitación (riñón)	409.4	409.6	409.6	409.4	409.8	409.8
Porfirinas en orina (día 0)	0.45	0.93	0.8	1.32	0.61	0.96
Porfirinas en orina (día 25)	0.35	0.15	0.62	1.3	0.52	0.48
Porfirinas en orina (día 45)	0.98	0.43	0.91	1.1	0.6	1.01
Porfirinas en orina (día 56)	0.71	0.29	0.15	0.34	0.44	0.27
Máximo de excitación (día 0)	404.8	404.4	405.6	405.2	404.8	405.2
Máximo de excitación (día 25)	403.8	405.2	404.4	405	403.8	405
Máximo de excitación (día 45)	404.6	404.6	405	405	404.8	405
Máximo de excitación (día 56)	404.6	404.8	405	404.4	404.6	404.4
ALA en orina (día 0)	7.8	5.3	1.4	0.88	1376	0.1
ALA en orina (día 25)	5.03	1.98	0.9	4.9	0.157	1.45
ALA en orina (día 45)	0	0	0	0	0	0
ALA en orina (día 56)	2.54	0	1.73	2.21	1.06	4.2
PBG en orina (día 0)	1.8	4.8	1.6	1.1	1.51	1.63
PBG en orina (día 25)	9.9	6.7	5.4	3.9	7.81	6.4
PBG en orina (día 45)	4.02	0.8	2.8	2.85	2.05	3.23
PBG en orina (día 56)	9.9	6.7	4.4	4.7	1.09	5.46

TABLA 9.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS QUE RECIBIERON PLOMO + SAMe (final)

Identificación	PS7	PS8	PS9	PS10	PS11
Peso rata	270	275	243	277	274
Peso hígado	8.6	7.87	7.11	8.03	8.52
Peso hígado/Peso rata	0.032	0.0286	0.029	0.029	0.031
Peso riñón	1.92	2.18	1.65	1.9	1.89
ALA-D sangre	1.84	0.34	0.74	0.66	0.55
ALA-D activada sangre	14.31	9.84	13.56	10.76	11.12
PBG-D sangre	29.85	33.7	28.32	36.35	27.52
PPE	92.1	93.17	101.13	94.42	112.93
ZPP/PEL	1.42	1.49	1.33	1.48	1.38
Plumbemia	53.6	54.3	52.3	59.3	66.6
ALA-D hígado	0.247	0.245	0.21	0.229	0.216
ALA-D activada hígado	0.282	0.29	0.258	0.277	0.255
PBG-D hígado	0.153	0.157	0.13	0.151	0.149
ALA-S hígado	0.093	0.083	0.092	0.074	0.081
GSH hígado	1336.9	1131.1	1396.5	1349.7	1674.8
Pb hígado	1.45	1.97	2.1	1.96	2.55
Zn hígado	92.24	96.93	92.43	87.51	86.48
Fe hígado	593.4	550.9	549.24	383.83	526.79
Cu hígado	12.16	15.9	13.56	13.35	13.7
ALA-D riñón	0.041	0.048	0.051	0.045	0.052
ALA-D activada riñón	0.089	0.094	0.098	0.087	0.102
PBG-D riñón	0.091	0.096	0.089	0.097	0.091
ALA-S riñón	0.208	0.121	0.114	0.104	0.14
Pb riñón	18.49	19.48	23.69	30.41	31.44
Zn riñón	106.95	86.35	79.22	107.26	81.44
Fe riñón	253.13	285.62	275.97	363.32	326.65
Cu riñón	27.81	26.07	27.92	40.14	25.96
Hematocrito	46	43	43	43	44
COPRO hígado	0	0	0	0	0
URO hígado	0.06	0.046	0.054	0.047	0.05
PROTO hígado	0.19	0.157	0.17	0.17	0.16
Porfirinas en hígado	0.25	0.203	0.224	0.217	0.21
Máximo de excitación (hígado)	411.4	411.6	412.2	410.2	411.8
COPRO riñón	0	0	0	0	0
URO riñón	0.2	0.16	0.2	0.21	0.225
PROTO riñón	0.21	0.27	0.3	0.31	0.27
Porfirinas en riñón	0.41	0.43	0.5	0.52	0.495
Máximo de excitación (riñón)	410	410.4	411.2	410.2	410
Porfirinas en orina (día 0)	0.35	1	1.11	0.91	0.69
Porfirinas en orina (día 25)	0.13	0.21	0.36	0.58	0.4
Porfirinas en orina (día 45)	0.21	0.18	0.3	0.43	0.25
Porfirinas en orina (día 56)	0.63	0.39	0.81	0.84	0.44
Máximo de excitación (día 0)	404.4	404	404	404	404.8
Máximo de excitación (día 25)	405	404.2	404.2	404.2	404.2
Máximo de excitación (día 45)	404.8	404.2	404.4	404.2	404.4
Máximo de excitación (día 56)	404.4	404.2	404.2	404.2	404.4
ALA en orina (día 0)	1.3	3.2	1.6	2	2.6
ALA en orina (día 25)	0.8	7.7	5.7	13.2	9.3
ALA en orina (día 45)	1.2	1.8	2.9	1.1	0.1
ALA en orina (día 56)	1.1	5.2	5.2	2.8	8.5
PBG en orina (día 0)	2.2	3.2	3.4	3.3	6.6
PBG en orina (día 25)	4.3	5	5.2	17.4	3.5
PBG en orina (día 45)	5.1	2.8	6.1	4.7	6.3
PBG en orina (día 56)	8.1	3.1	6.1	3.4	5.7

TABLA 10.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS QUE RECIBIERON ALCOHOL + PLOMO

Identificación	AP1	AP2	AP3	AP4	AP5	AP6
Peso rata	224	210	226	215	200	210
Peso hígado	7.7	7.9	8.4	7.6	7.8	8.5
Peso hígado/Peso rata	0.034	0.037	0.037	0.035	0.039	0.04
Peso riñón	2.2	1.8	2	1.7	7.1	2.2
ALA-D sangre	0.29	0.79	0.45	0.28	0.15	0.58
ALA-D activada sangre	9.03	15.57	16.05	12.54	9.13	9.92
PBG-D sangre	11.18	40.86	26.12	24.42	22.59	20.83
PPE	80.63	88.7	77.94	108.12	111.55	86.01
ZPP/PEL	1.48			1.47	1.35	1.34
Plumbemia	96.72			80.52	74.82	78.76
ALA-D hígado	0.17	0.13	0.132	0.118	0.14	0.146
ALA-D activada hígado	0.26	0.26	0.25	0.249	0.25	0.252
PBG-D hígado	0.12	0.12	0.119	0.112	0.16	0.13
ALA-S hígado						
GSH hígado						
Pb hígado	6.11	5.13	6.36	5.95	5.95	7.91
Zn hígado	86	74.7	77.9	79.8	78.6	75.1
Fe hígado	1142.1	739.9	955.4	836.3	952.6	735.3
Cu hígado	11.2	11.7	12.3	10.8	12.1	12.2
ALA-D riñón	0.03	0.038	0.026	0.097	0.03	0.027
ALA-D activada riñón	0.1	0.123	0.98	0.133	0.113	0.104
PBG-D riñón	0.067	0.084	0.069	0.083	0.087	0.063
ALA-S riñón						
Pb riñón	45.71	32.33	52.79	45.26	42.19	44.4
Zn riñón	55.9	58.4	58.1	62.5	50.7	56
Fe riñón	403	351.8	381.4	409.1	373.2	367.2
Cu riñón	20.5	12	13.9	13.2	12.2	12.4
Hematocrito	52	44	43	53	51	46
COPRO hígado	0	0	0	0	0	0
URO hígado	0.032	0.024	0.011	0.023	0.022	0.023
PROTO hígado	0.133	0.126	0.14	0.12	0.12	0.125
Porfirinas en hígado	0.165	0.15	0.151	0.143	0.142	0.148
Máximo de excitación (hígado)	412.2	411.6	411.6	412.2	411.6	411.8
COPRO riñón	0	0	0	0	0	0
URO riñón	0.23	0.23	0.22	0.29	0.15	0.21
PROTO riñón	0.33	0.63	0.34	0.54	0.32	0.35
Porfirinas en riñón	0.56	0.86	0.56	0.83	0.47	0.56
Máximo de excitación (riñón)	410.2	409.8	410.6	411.8	411	410.2
Porfirinas en orina (día 0)	0.27	1.08	0.74	0.59	0.35	0.26
Porfirinas en orina (día 25)	0.87	1.15	1.2	0.83	0.79	0.64
Porfirinas en orina (día 45)	0.71	0.86	0.93	0.56	0.93	0.69
Porfirinas en orina (día 56)	0.6	0.39	0.79	1	0.98	0.62
Máximo de excitación (día 0)	405.6	404.2	404.6	404.4	405	405
Máximo de excitación (día 25)	404.6	404.4	404.6	404.6	404.6	404.6
Máximo de excitación (día 45)	404	404	404	404	404	404
Máximo de excitación (día 56)	404.8	405.2	405	404	404.6	404.6
ALA en orina (día 0)	3.2	4.6	7.7	3.9	6.1	2.87
ALA en orina (día 25)	1.12	1.77	2	0	2.6	1.6
ALA en orina (día 45)	2	3.8	3.3	3.3	2.7	4.2
ALA en orina (día 56)	3.27	2.7	2.2	2.5	0.2	1.1
PBG en orina (día 0)	11.8	6.6	3.25	5.24	5.13	3.7
PBG en orina (día 25)	8.3	6.2	10.9	6.4	6	5.73
PBG en orina (día 45)	2.4	4.1	6.5	2.7	1.9	1.95
PBG en orina (día 56)	12.57	0.77	1.2	9.2	3.34	0

TABLA 10.- DETERMINACIONES ANALITICAS EN RATAS QUE RECIBIERON ALCOHOL + PLOMO (final)

Identificación	AP7	AP8	AP9	AP10	AP11
Peso rata	243	254	256	235	237
Peso hígado	7.62	6.39	8.19	6.67	7.54
Peso hígado/Peso rata	0.031	0.025	0.032	0.028	0.032
Peso riñón	1.66	1.69	1.87	1.63	1.76
ALA-D sangre	0.92	2.34	1.44	2.02	1.42
ALA-D activada sangre	13.52	10.88	16.52	15.6	17.21
PBG-D sangre	38.48	31.63	41.03	44.36	44.49
PPE	100.6	73.5	98.58	82.41	95.03
ZPP/PEL	1.42	1.44	1.28	1.32	1.33
Plumbemia	49.8	31.3	71.9	40.8	67.8
ALA-D hígado	0.16	0.184	0.155	0.182	0.179
ALA-D activada hígado	0.208	0.254	0.196	0.23	0.194
PBG-D hígado	0.134	0.152	0.109	0.146	0.146
ALA-S hígado	0.154	0.235	0.256	0.296	0.278
GSH hígado	1209.3	1036	1030.2	1447.2	1304.5
Pb hígado	1.86	1.86	1.92	1.77	1.91
Zn hígado	85.75	81.5	88.68	99.63	101.7
Fe hígado	493.94	646.11	572.87	539.32	485.97
Cu hígado	16.42	17.14	22.05	17.32	17.78
ALA-D riñón	0.04	0.036	0.041	0.059	0.05
ALA-D activada riñón	0.079	0.067	0.07	0.102	0.072
PBG-D riñón	0.095	0.081	0.1	0.109	0.107
ALA-S riñón	0.39	0.358	0.323	0.314	0.341
Pb riñón	25	11.26	21.42	17.72	18.84
Zn riñón	76.03	69.78	70.47	74.46	85.89
Fe riñón	341.49	329.62	280.35	282.86	298.36
Cu riñón	23.97	25.17	38.42	24.7	35.51
Hematocrito	48	51	43	41	41
COPRO hígado	0	0	0	0	0
URO hígado	0.031	0.056	0.05	0.048	0.049
PROTO hígado	0.156	0.186	0.176	0.193	0.19
Porfirinas en hígado	0.374	0.242	0.226	0.241	0.239
Máximo de excitación (hígado)	411.2	411.2	410.8	411.6	412.6
COPRO riñón	0	0	0	0	0
URO riñón	0.145	0.21	0.38	0.202	0.2
PROTO riñón	0.43	0.36	0.46	0.35	0.41
Porfirinas en riñón	0.575	0.57	0.84	0.552	0.61
Máximo de excitación (riñón)	410.6	410.8	410	410.2	411
Porfirinas en orina (día 0)	1.23	0.89	0.23	0.62	0.96
Porfirinas en orina (día 25)	1.04	0.89	0.4	0.5	0.84
Porfirinas en orina (día 45)	0.7	0.63	0.91	0.4	0.83
Porfirinas en orina (día 56)	1.23	0.8	1.57	1.72	0.9
Máximo de excitación (día 0)	404.4	404.4	404.8	404.4	404.2
Máximo de excitación (día 25)	404	404	404	404.2	404.2
Máximo de excitación (día 45)	404.2	404.2	404.6	403.4	404.2
Máximo de excitación (día 56)	403.6	403.6	403.8	404.4	403.8
ALA en orina (día 0)	11.1	15.9	6	6.3	2.37
ALA en orina (día 25)	1.5	2.2	2.2	0.93	2.1
ALA en orina (día 45)	0	0	0.86	2.2	0
ALA en orina (día 56)	3.5	2.6	3.7	4.9	3.3
PBG en orina (día 0)	2.3	11.1	4.2	7.1	13.4
PBG en orina (día 25)	0.7	0.6	0.15	0.15	3.5
PBG en orina (día 45)	4.8	5.1	7.1	8.8	3.9
PBG en orina (día 56)	4.3	6.3	1.33	9.6	4.9

TABLA 11.- RESULTADOS EN RATAS QUE RECIBIERON ALCOHOL + PLOMO + SAMe

Identificación	APS1	APS2	APS3	APS4	APS5	APS6
Peso rata	255	262	265	235	240	285
Peso hígado	6.8	7.4	6.8	6.5	7	9.63
Peso hígado/Peso rata	0.027	0.028	0.025	0.027	0.029	0.033
Peso riñón	1.8	1.9	1.7	1.7	1.6	2.01
ALA-D sangre	0.862	0.73	0.602	0.82	0.897	0.53
ALA-D activada sangre	23.44	17.49	13.3	18.63	23.81	15.6
PBG-D sangre	67.1	51.54	55.28	47.86	69.02	28.43
PPE						72.25
ZPP/PEL						1.36
Plumbemia						75.3
ALA-D hígado	0.112	0.128	0.123	0.13	0.13	0.17
ALA-D activada hígado	0.267	0.248	0.226	0.24	0.259	0.235
PBG-D hígado	0.305	0.269	0.228	0.226	0.24	0.124
ALA-S hígado	0.076	0.147	0.12	0.13	0.12	0.231
GSH hígado						1475.9
Pb hígado	5.91		6.53			1.53
Zn hígado	114.9	123.5	111.11	103.4	110.3	107.51
Fe hígado	587.8	596.9	591.5	843.5	574.4	692.19
Cu hígado	19.86	19.39	20.58	20.42	21.71	13.2
ALA-D riñón	0.011	0.011	0.015	0.013	0.015	0.043
ALA-D activada riñón	0.075	0.067	0.062	0.07	0.072	0.079
PBG-D riñón	0.199	0.182	0.156	0.157	0.123	0.089
ALA-S riñón	0.097	0.097	0.091	0.14	0.13	0.16
Pb riñón	36.4	21.87	39.95	42.9	30.65	13.26
Zn riñón	73.3	78.59	99.3	89.1	77.3	95.46
Fe riñón	250.6	292.7	321.5	293.7	315.2	292.77
Cu riñón	23.19	32.5	41.13	25.08	20.63	31.92
Hematocrito	44	43	45	47	43	44
COPRO hígado	0	0	0	0	0	0
URO hígado	0.032	0.02	0.028	0.029	0.011	0.075
PROTO hígado	0.23	0.17	0.18	0.19	0.13	0.12
Porfirinas en hígado	0.262	0.19	0.208	0.219	0.141	0.195
Máximo de excitación (hígado)	410.8	412.2	411.2	411.6	413	411.4
COPRO riñón	0	0	0	0	0	0
URO riñón	0.38	0.31	0.35	0.27	0.24	0.016
PROTO riñón	0.26	0.28	0.19	0.22	0.19	0.25
Porfirinas en riñón	0.64	0.59	0.54	0.49	0.43	0.266
Máximo de excitación (riñón)	409.6	409.6	409.6	409.8	409.4	410.8
Porfirinas en orina (día 0)	0.54	0.6	0.7	0.55	1.6	0.3
Porfirinas en orina (día 25)	0.59	0.45	0.58	0.94	0.44	0.14
Porfirinas en orina (día 45)	0.21	0.39	0.48	0.49	0.4	0.34
Porfirinas en orina (día 56)	0.44	0.54	0.55	0.8	0.94	0.28
Máximo de excitación (día 0)	404.8	405.4	405.4	404.8	404.8	404.4
Máximo de excitación (día 25)	404.2	404.4	404.4	404.6	404.4	404.6
Máximo de excitación (día 45)	404.6	405.2	405	405	405.2	404.8
Máximo de excitación (día 56)	404.8	404.8	405	405	405.2	403.8
ALA en orina (día 0)	3.6	1.03	0.4	0	1.32	5.1
ALA en orina (día 25)	0.45	4.3	3.9	2.1	2.5	0
ALA en orina (día 45)	0.7	0.5	4.9	0	0	3.3
ALA en orina (día 56)	18.5	2.3	7.9	2.3	1.5	0
PBG en orina (día 0)	11.4	4.8	3.8	3.3	4.5	4.9
PBG en orina (día 25)	5.5	3.9	6.1	2.2	4.5	2.5
PBG en orina (día 45)	4.16	2.9	4.2	4.15	4.52	3
PBG en orina (día 56)	7.01	4.9	7.1	3.9	1.95	2.91

TABLA 11.- RESULTADOS EN RATAS QUE RECIBIERON ALCOHOL + PLOMO + SAMe (final)

Identificación	APS7	APS8	APS9	APS10
Peso rata	282	263	270	247
Peso hígado	8.82	7.63	8.14	6.82
Peso hígado/Peso rata	0.031	0.029	0.03	0.027
Peso riñón	1.98	1.83	1.96	1.66
ALA-D sangre	0.98	1.59	1.57	1.46
ALA-D activada sangre	21.8	14.22	17.47	18.39
PBG-D sangre	32.54	32	31.17	24.78
PPE	115.51	75.71	70.83	74.34
ZPP/PEL	1.33	1.31	1.37	1.38
Plumbemia	75.9	43.4	120.1	71.5
ALA-D hígado	0.174	0.185	0.203	0.204
ALA-D activada hígado	0.281	0.242	0.263	0.236
PBG-D hígado	0.147	0.138	0.137	0.134
ALA-S hígado	0.314	0.174	0.228	0.198
GSH hígado	1081.7	1276.6	1324.5	1390.4
Pb hígado	4.55	1.62	2.68	3.26
Zn hígado	90.67	85.46	97.67	108
Fe hígado	658.03	527.1	638.66	762.5
Cu hígado	14.7	14.48	16.12	16.95
ALA-D riñón	0.041	0.046	0.04	0.041
ALA-D activada riñón	0.082	0.093	0.074	0.0746
PBG-D riñón	0.186	0.096	0.084	0.079
ALA-S riñón	0.189	0.369	0.314	0.48
Pb riñón	14.83	14.16	26.3	14.93
Zn riñón	112.79	92.55	88.31	65.41
Fe riñón	230.9	261.8	305.7	307.12
Cu riñón	18.82	31.64	27.76	22.42
Hematocrito	44	45	42	45
COPRO hígado	0	0	0	0.008
URO hígado	0.058	0.073	0.038	0.009
PROTO hígado	0.145	0.142	0.13	0.102
Porfirinas en hígado	0.203	0.215	0.168	0.119
Máximo de excitación (hígado)	411.2	412.2	411.2	412.4
COPRO riñón	0	0	0	0
URO riñón	0.5	0.17	0.11	0.12
PROTO riñón	0.31	0.21	0.15	0.22
Porfirinas en riñón	0.81	0.38	0.26	0.34
Máximo de excitación (riñón)	410.2	410.8	410.6	411.2
Porfirinas en orina (día 0)	0.37	0.32	0.3	0.33
Porfirinas en orina (día 25)	0.16	0.22	0.14	0.28
Porfirinas en orina (día 45)	0.37	0.96	0.76	0.61
Porfirinas en orina (día 56)	0.27	0.23	0.18	0.19
Máximo de excitación (día 0)	404.2	404.6	405	405.3
Máximo de excitación (día 25)	404.4	404.4	404.6	404.8
Máximo de excitación (día 45)	404.6	405.2	404.8	404.4
Máximo de excitación (día 56)	404.2	403.8	404.6	404
ALA en orina (día 0)	1.2	5.5	8.1	11.2
ALA en orina (día 25)	0	0	0	1.3
ALA en orina (día 45)	1.5	4.4	5.2	5.6
ALA en orina (día 56)	0	0	0.34	2.8
PBG en orina (día 0)	5.7	6.6	4.9	4.7
PBG en orina (día 25)	4.3	2.7	0.96	5.7
PBG en orina (día 45)	0	2	3.6	4.9
PBG en orina (día 56)	3.5	1.8	6.22	3.4

TABLA 12.- MEDIDAS DE CENTRALIZACION Y DISPERSION EN RATAS CONTROLES

	MEDIA	MEDIANA	Desv.estándar	Percentil 25	Percentil 75
Peso rata	240	236	16.2	228	255
Peso hígado	7.69	6.8	1.85	6.4	9.7
Peso hígado/Peso rata	0.031	0.029	0.0057	0.026	0.038
Peso riñón	1.95	1.8	0.4	1.6	2.3
ALA-D sangre	4.5	4.25	1.33	3.73	5.61
ALA-D activada sangre	7.3	7.3	1.55	6.36	8.59
PBG-D sangre	29.3	21.7	16.5	16.8	44.3
PPE	52.37	50	17.7	37.7	60.6
ZPP/PEL	1.63	1.55	0.27	1.39	1.9
Plumbemia	6.15	5.6	2.7	4.4	8.3
ALA-D hígado	0.21	0.21	0.04	0.17	0.25
ALA-D activada hígado	0.236	0.22	0.06	0.18	0.28
PBG-D hígado	0.13	0.11	0.04	0.09	0.17
ALA-S hígado	0.089	0.09	0.04	0.06	0.12
GSH hígado	1556.4	1521.4	275.4	1375.1	1761.1
Pb hígado	0.67	0.44	0.55	0.3	0.99
Zn hígado	110.6	101.6	28.8	95.7	117.8
Fe hígado	592.3	603	228.7	392	704.1
Cu hígado	17.6	14.9	13.7	12.5	17.5
ALA-D riñón	0.056	0.06	0.016	0.04	0.07
ALA-D activada riñón	0.07	0.075	0.021	0.046	0.09
PBG-D riñón	0.089	0.082	0.024	0.07	0.12
ALA-S riñón	0.127	0.1	0.053	0.09	0.17
Pb riñón	2.09	2.01	1.41	0.7	3.02
Zn riñón	75.6	80.1	11.34	63.6	85.2
Fe riñón	351.9	351.8	65.77	291.5	409.3
Cu riñón	20.6	20.6	6.03	16.9	21.4
Hematocrito	46.8	46	2.41	45	49
COPRO hígado	0	0	0	0	0
URO hígado	0.035	0.03	0.012	0.026	0.04
PROTO hígado	0.17	0.16	0.08	0.13	0.18
Porfirinas en hígado	0.025	0.18	0.08	0.17	0.21
Máximo de excitación (hígado)	411.5	411.4	0.47	411.2	412
COPRO riñón	0	0	0	0	0
URO riñón	0.355	0.26	0.18	0.22	0.56
PROTO riñón	0.37	0.33	0.23	0.22	0.43
Porfirinas en riñón	0.728	0.63	0.38	0.44	1.05
Máximo de excitación (riñón)	410.1	410.2	0.67	409.8	410.4
Porfirinas en orina (día 0)	0.57	0.44	0.29	0.4	0.83
Porfirinas en orina (día 25)	0.63	0.61	0.26	0.4	0.81
Porfirinas en orina (día 45)	0.54	0.45	0.29	0.32	0.81
Porfirinas en orina (día 56)	0.74	0.63	0.45	0.34	0.98
Máximo de excitación (día 0)	404.6	404.6	0.48	404.2	404.6
Máximo de excitación (día 25)	404.8	404.8	0.8	404.6	405
Máximo de excitación (día 45)	404.9	404.8	0.71	404.2	405.2
Máximo de excitación (día 56)	404.7	404.8	0.34	404.4	405
ALA en orina (día 0)	1.05	0.6	1.44	0.01	1.1
ALA en orina (día 25)	2.58	0.91	3.8	0	2.58
ALA en orina (día 45)	4.3	4.37	2.6	1.85	7.01
ALA en orina (día 56)	3.12	2.36	2.73	1.35	3.85
PBG en orina (día 0)	5.52	2.8	4.1	2.3	10.2
PBG en orina (día 25)	3.78	3.35	2.2	2.7	4.25
PBG en orina (día 45)	4.89	2.54	4.65	2.2	7.7
PBG en orina (día 56)	4.5	4.8	2.59	2.47	6.26

TABLA 13.- MEDIDAS DE CENTRALIZACION Y DISPERSION EN RATAS QUE RECIBIERON SAME

	MEDIA	MEDIANA	Desv.estándar	Percentil 25	Percentil 75
Peso rata	251.2	253	10.34	242	256
Peso hígado	7.26	7.29	0.83	6.8	7.8
Peso hígado/Peso rata	0.029	0.029	0.003	0.027	0.031
Peso riñón	1.62	1.6	0.14	1.55	1.7
ALA-D sangre	3.78	2.27	2.42	1.85	5.98
ALA-D activada sangre	7.15	7.14	2.52	4.94	8.89
PBG-D sangre	28.73	25.8	9.5	19.8	38.8
PPE	49.2	52.4	13.7	40.4	56.3
ZPP/PEL	1.48	1.49	0.09	1.43	1.5
Plumbemia	5.25	4.85	2.18	3.5	5.65
ALA-D hígado	0.18	0.17	0.028	0.16	0.18
ALA-D activada hígado	0.25	0.25	0.05	0.2	0.29
PBG-D hígado	0.19	0.22	0.063	0.13	0.24
ALA-S hígado	0.12	0.12	0.06	0.066	0.18
GSH hígado	1456.4	1530.7	169.3	1309.1	1550.5
Pb hígado	0.76	0.73	0.25	0.64	0.88
Zn hígado	103.4	102.1	13.11	93.12	114.3
Fe hígado	685.3	667	170.4	526.5	817.1
Cu hígado	17.78	16.2	4.6	14.8	22.1
ALA-D riñón	0.035	0.025	0.016	0.021	0.052
ALA-D activada riñón	0.06	0.062	0.009	0.052	0.067
PBG-D riñón	0.12	0.12	0.025	0.1	0.15
ALA-S riñón	0.18	0.15	0.13	0.1	0.24
Pb riñón	0.6	0.61	0.2	0.46	0.76
Zn riñón	86.6	86.2	5.74	82.9	91.1
Fe riñón	356.8	353.4	33.6	321.4	389.6
Cu riñón	26.8	25.8	6.09	21.7	33.3
Hematocrito	45.5	44	4.48	43	49
COPRO hígado	0	0	0	0	0
URO hígado	0.05	0.05	0.019	0.03	0.07
PROTO hígado	0.15	0.16	0.045	0.12	0.18
Porfirinas en hígado	0.2	0.21	0.057	0.16	0.24
Máximo de excitación (hígado)	411.2	411.3	0.92	410.4	411.8
COPRO riñón	0	0	0	0	0
URO riñón	0.18	0.16	0.077	0.13	0.21
PROTO riñón	0.23	0.21	0.091	0.16	0.28
Porfirinas en riñón	0.42	0.37	0.15	0.28	0.53
Máximo de excitación (riñón)	410.01	410.2	0.42	409.6	410.4
Porfirinas en orina (día 0)	0.93	0.88	0.51	0.4	1.4
Porfirinas en orina (día 25)	0.39	0.41	0.13	0.29	0.46
Porfirinas en orina (día 45)	0.31	0.28	0.12	0.21	0.4
Porfirinas en orina (día 56)	0.37	0.34	0.12	0.25	0.52
Máximo de excitación (día 0)	404.5	404.6	0.57	404.2	405
Máximo de excitación (día 25)	404.5	404.6	0.65	404	404.8
Máximo de excitación (día 45)	404.9	405	0.38	404.4	405.2
Máximo de excitación (día 56)	404.4	404.4	0.37	404.2	404.8
ALA en orina (día 0)	0.81	0.24	0.91	0.07	1.7
ALA en orina (día 25)	0.86	0.27	1.52	0	0.82
ALA en orina (día 45)	0.74	0.4	1.16	0	0.84
ALA en orina (día 56)	2.36	0.75	3.5	0.2	5.13
PBG en orina (día 0)	3.58	3.4	3.72	0.15	6.1
PBG en orina (día 25)	4.13	3.74	3.92	0	8.3
PBG en orina (día 45)	5.77	4.1	4.66	2.1	9.9
PBG en orina (día 56)	5.17	3.34	1.82	2.6	4.4

TABLA 14.- MEDIDAS DE CENTRALIZACION Y DISPERSION (GRUPO ALCOHOL)

	MEDIA	MEDIANA	Desv.estándar	Percentil 25	Percentil 75
Peso rata	230.3	223	22.07	211	250
Peso hígado	7.95	7.75	0.78	7.38	8.8
Peso hígado/Peso rata	0.035	0.034	0.0047	0.03	0.039
Peso riñón	1.89	1.84	0.26	1.6	2.1
ALA-D sangre	3.32	3	0.67	2.86	4
ALA-D activada sangre	8.22	8.07	1.09	7.16	9.41
PBG-D sangre	31.34	28.6	10.54	21.5	43.2
PPE	61.7	62.3	12.04	56.1	69.5
ZPP/PEL	1.22	1.26	0.07	1.16	1.26
Plumbemia	9.8	10.01	3.3	6.9	11.5
ALA-D hígado	0.16	0.16	0.03	0.14	0.19
ALA-D activada hígado	0.19	0.19	0.024	0.17	0.22
PBG-D hígado	0.16	0.12	0.08	0.107	0.2
ALA-S hígado	0.064	0.05	0.026	0.045	0.08
GSH hígado	1262.6	1340	249.1	1233.8	1385.1
Pb hígado	0.68	0.6	0.33	0.5	0.8
Zn hígado	92.46	91.5	6.54	87.1	95.25
Fe hígado	818.8	807.3	177.8	747.2	971.6
Cu hígado	15.59	15.2	1.37	14.6	16.9
ALA-D riñón	0.043	0.044	0.006	0.038	0.047
ALA-D activada riñón	0.06	0.06	0.005	0.056	0.062
PBG-D riñón	0.125	0.108	0.08	0.074	0.176
ALA-S riñón	0.1	0.09	0.027	0.087	0.11
Pb riñón	2.67	3.1	1.15	1.3	3.5
Zn riñón	68.29	68.3	13.7	56.3	82.2
Fe riñón	362.9	347.6	43.72	335.6	372.2
Cu riñón	24.62	25.77	5.2	19.3	28.8
Hematocrito	46.7	47	4.45	46	51
COPRO hígado	0.002	0	0.003	0	0.003
URO hígado	0.038	0.03	0.023	0.02	0.054
PROTO hígado	0.12	0.12	0.041	0.08	0.155
Porfirinas en hígado	0.16	0.15	0.058	0.12	0.21
Máximo de excitación (hígado)	411.6	411.6	0.54	411.4	412
COPRO riñón	0	0	0	0	0
URO riñón	0.36	0.32	0.23	0.17	0.58
PROTO riñón	0.42	0.46	0.14	0.25	0.55
Porfirinas en riñón	0.78	0.74	0.33	0.48	1.12
Máximo de excitación (riñón)	410.4	410.4	0.37	410.2	410.6
Porfirinas en orina (día 0)	0.79	0.85	0.34	0.42	1.11
Porfirinas en orina (día 25)	0.36	0.36	0.18	0.21	0.51
Porfirinas en orina (día 45)	0.32	0.29	0.14	0.23	0.43
Porfirinas en orina (día 56)	0.67	0.63	0.25	0.49	0.83
Máximo de excitación (día 0)	404.3	404.2	0.24	404	404.4
Máximo de excitación (día 25)	404.6	404.6	0.23	404.4	404.8
Máximo de excitación (día 45)	404.4	404.2	0.26	404.2	404.6
Máximo de excitación (día 56)	404.5	404.6	0.45	404	404.8
ALA en orina (día 0)	4.58	4.62	3.29	2.7	5.38
ALA en orina (día 25)	1.15	0.7	1.25	0	2.2
ALA en orina (día 45)	1.46	0.76	1.53	0.48	2.2
ALA en orina (día 56)	1.05	0.84	1.17	0	1.9
PBG en orina (día 0)	2.59	2.29	1.15	1.8	3.25
PBG en orina (día 25)	8.1	7.24	3.44	6.1	9.6
PBG en orina (día 45)	3.48	2.65	3.66	2.04	3.2
PBG en orina (día 56)	5.31	5.6	1.44	4.5	6.3

TABLA 15.- MEDIDAS DE CENTRALIZACION Y DISPERSION (GRUPO ALCOHOL+ SAMe)

	MEDIA	MEDIANA	Desv.estándar	Percentil 25	Percentil 75
Peso rata	253.6	253	8.43	248	258
Peso hígado	7.53	7.6	0.34	7.35	7.8
Peso hígado/Peso rata	0.027	0.03	0.001	0.028	0.031
Peso riñón	1.62	1.6	0.16	1.55	1.71
ALA-D sangre	3.64	2.82	1.79	2.17	5.42
ALA-D activada sangre	6.05	3.79	3.3	3.01	8.83
PBG-D sangre	29.9	29.6	4.2	26.9	34.46
PPE	43.8	38.3	17.2	28.8	62.3
ZPP/PEL	1.09	1.08	0.04	1.06	1.12
Plumbemia	5.86	5.1	1.62	4.3	7.04
ALA-D hígado	0.17	0.166	0.033	0.14	0.2
ALA-D activada hígado	0.2	0.2	0.022	0.18	0.22
PBG-D hígado	0.17	0.2	0.054	0.12	0.21
ALA-S hígado	0.093	0.076	0.04	0.062	0.123
GSH hígado	1387	1290.9	217.7	1287.9	1604
Pb hígado	0.53	0.5	0.25	0.45	0.53
Zn hígado	99.9	97.66	10.6	92.03	108.5
Fe hígado	744.7	733.3	254	518.5	925.4
Cu hígado	18.48	17.3	5.12	15.5	20.6
ALA-D riñón	0.057	0.052	0.014	0.04	0.07
ALA-D activada riñón	0.077	0.075	0.008	0.069	0.086
PBG-D riñón	0.15	0.18	0.054	0.086	0.123
ALA-S riñón	0.21	0.13	0.17	0.11	0.32
Pb riñón	0.76	0.44	0.73	0.4	0.56
Zn riñón	88.28	84.3	11.45	79.1	97.6
Fe riñón	356.9	367.4	42.08	328.1	389.1
Cu riñón	30.44	28.8	4.76	28.47	32.5
Hematocrito	43.8	44	2.75	41	45
COPRO hígado	0	0	0	0	0
URO hígado	0.04	0.03	0.023	0.023	0.065
PROTO hígado	0.23	0.18	0.14	0.17	0.23
Porfirinas en hígado	0.27	0.5	0.13	0.33	0.56
Máximo de excitación (hígado)	411.6	411.6	0.6	411.4	411.8
COPRO riñón	0	0	0	0	0
URO riñón	0.18	0.18	0.05	0.16	0.2
PROTO riñón	0.19	0.19	0.044	0.18	0.21
Porfirinas en riñón	0.37	0.38	0.07	0.32	0.45
Máximo de excitación (riñón)	409.9	410	0.68	409.6	410.6
Porfirinas en orina (día 0)	0.78	0.69	0.56	0.4	1.14
Porfirinas en orina (día 25)	0.5	0.55	0.3	0.2	0.75
Porfirinas en orina (día 45)	0.47	0.44	0.24	0.29	0.56
Porfirinas en orina (día 56)	0.48	0.5	0.16	0.33	0.56
Máximo de excitación (día 0)	404.4	404.4	0.41	404.4	404.8
Máximo de excitación (día 25)	404.6	404.6	0.39	404.2	404.8
Máximo de excitación (día 45)	404.7	404.8	0.59	404.2	405.2
Máximo de excitación (día 56)	404.2	404.2	0.49	403.8	404.6
ALA en orina (día 0)	0.61	0.9	0.6	0	1
ALA en orina (día 25)	2.19	2.27	1.41	1.3	3.5
ALA en orina (día 45)	0.9	0.4	1.26	0	1.6
ALA en orina (día 56)	1.36	0.94	1.43	0.3	1.5
PBG en orina (día 0)	1.41	0.82	1.65	0	3.21
PBG en orina (día 25)	1.81	1.8	1.17	0.8	2.6
PBG en orina (día 45)	3.45	2.9	2.42	1.2	5.7
PBG en orina (día 56)	5.17	4.9	2	3.5	6

TABLA 16.- MEDIDAS DE CENTRALIZACION Y DISPERSION (GRUPO PLOMO)

	MEDIA	MEDIANA	Desv.estándar	Percentil 25	Percentil 75
Peso rata	261	260.5	12.8	251	263
Peso hígado	8.08	7.96	1.38	7.23	9.6
Peso hígado/Peso rata	0.031	0.03	0.0055	0.026	0.035
Peso riñón	1.98	1.91	0.31	1.75	2.2
ALA-D sangre	0.76	0.44	0.74	0.29	1.44
ALA-D activada sangre	11.74	11.7	3.17	8.48	13.7
PBG-D sangre	29.39	29	12.93	18.2	40.9
PPE	115.3	96.7	32.79	91.6	138.3
ZPP/PEL	1.56	1.56	0.089	1.49	1.61
Plumbemia	83.85	82.7	24.72	66.5	106.7
ALA-D hígado	0.16	0.15	0.036	0.13	0.17
ALA-D activada hígado	0.26	0.22	0.1	0.19	0.31
PBG-D hígado	0.12	0.127	0.027	0.117	0.14
ALA-S hígado	0.25	0.22	0.076	0.19	0.29
GSH hígado	1363.6	1266.2	233.7	1200.1	1607.1
Pb hígado	3.77	3.7	1.4	2.7	4.3
Zn hígado	102.74	103	18.97	93	115.1
Fe hígado	790.6	700.4	221.7	667.7	923.1
Cu hígado	14.36	14.7	5.02	10.9	18
ALA-D riñón	0.06	0.05	0.02	0.046	0.07
ALA-D activada riñón	0.116	0.11	0.03	0.088	0.14
PBG-D riñón	0.11	0.096	0.018	0.093	0.12
ALA-S riñón	0.23	0.23	0.033	0.23	0.25
Pb riñón	36.97	33.5	17.3	24	49.9
Zn riñón	70.22	69.3	9.48	60.2	80.4
Fe riñón	340.8	315.5	85.12	292.2	425.7
Cu riñón	19.29	19.6	3.76	15.5	20.6
Hematocrito	46	45.5	3.83	42	49
COPRO hígado	0	0	0	0	0
URO hígado	0.1	0.033	0.22	0.02	0.057
PROTO hígado	0.16	0.14	0.07	0.11	0.2
Porfirinas en hígado	0.265	0.18	0.23	0.13	0.29
Máximo de excitación (hígado)	411.6	411.6	0.74	411.4	412.2
COPRO riñón	0	0	0	0	0
URO riñón	0.34	0.32	0.17	0.24	0.39
PROTO riñón	0.4	0.42	0.06	0.35	0.45
Porfirinas en riñón	0.75	0.71	0.18	0.63	0.79
Máximo de excitación (riñón)	410.4	410.4	0.43	410.2	410.8
Porfirinas en orina (día 0)	0.93	0.82	0.87	0.5	0.94
Porfirinas en orina (día 25)	0.78	0.75	0.36	0.4	1.05
Porfirinas en orina (día 45)	0.73	0.76	0.23	0.55	0.85
Porfirinas en orina (día 56)	0.83	0.83	0.17	0.72	0.91
Máximo de excitación (día 0)	404.2	404.2	0.43	403.8	404.6
Máximo de excitación (día 25)	404.3	404.2	0.38	404	404.8
Máximo de excitación (día 45)	404.2	404.2	0.4	403.8	404.6
Máximo de excitación (día 56)	404.3	404.2	0.49	403.8	404.8
ALA en orina (día 0)	3.15	4.15	4.15	0.7	2.5
ALA en orina (día 25)	3.02	1.68	1.68	1.8	4.23
ALA en orina (día 45)	2.36	1.98	1.98	0.8	3.6
ALA en orina (día 56)	2.01	1.85	1.46	0.98	2.65
PBG en orina (día 0)	7.18	4.8	4.8	4.3	9.6
PBG en orina (día 25)	2.04	1.88	1.88	1.2	3.3
PBG en orina (día 45)	4.48	2.3	2.3	3.2	5.3
PBG en orina (día 56)	3.02	2.85	1.77	1.7	3.8

TABLA 17.- MEDIDAS DE CENTRALIZACION Y DISPERSION (GRUPO PLOMO + SAME)

	MEDIA	MEDIANA	Desv.estándar	Percentil 25	Percentil 75
Peso rata	254.5	263	21.23	243	274
Peso hígado	7.38	7.2	0.95	7	8.03
Peso hígado/Peso rata	0.0289	0.029	0.0022	0.027	0.031
Peso riñón	1.8	1.8	0.19	1.7	1.9
ALA-D sangre	0.866	0.81	0.38	0.66	0.99
ALA-D activada sangre	16.89	16.18	5.7	11.12	22.17
PBG-D sangre	45.63	50.9	15.1	29.85	57.75
PPE	90.79	93.2	13.63	85.3	100.3
ZPP/PEL	1.42	1.42	0.067	1.38	1.48
Plumbemia	57.22	54.3	5.87	53.6	59.3
ALA-D hígado	0.19	0.21	0.046	0.15	0.23
ALA-D activada hígado	0.24	0.25	0.046	0.21	0.28
PBG-D hígado	0.186	0.153	0.066	0.146	0.263
ALA-S hígado	0.073	0.081	0.04	0.044	0.092
GSH hígado	1377.8	1349.7	194.8	1336.9	1396.5
Pb hígado	2	1.97	0.39	1.96	2.01
Zn hígado	107.4	96.93	19.2	92.24	120.8
Fe hígado	583.5	556.1	137.6	526.8	639.3
Cu hígado	17.39	17.18	3.96	13.56	21.44
ALA-D riñón	0.036	0.031	0.011	0.027	0.048
ALA-D activada riñón	0.083	0.083	0.012	0.074	0.094
PBG-D riñón	0.164	0.2	0.069	0.091	0.23
ALA-S riñón	0.117	0.11	0.061	0.072	0.14
Pb riñón	33.1	33.3	11.3	23.7	38.63
Zn riñón	94.2	86.6	19.36	80.8	106.9
Fe riñón	292.8	285.6	29.36	275.9	295.8
Cu riñón	29.4	27.8	5.75	26.07	33.76
Hematocrito	46.27	46	2.9	43	49
COPRO hígado	0	0	0	0	0
URO hígado	0.038	0.037	0.015	0.03	0.05
PROTO hígado	0.17	0.16	0.027	0.15	0.19
Porfirinas en hígado	0.21	0.21	0.032	0.18	0.24
Máximo de excitación (hígado)	411.6	411.6	0.996	411	412.2
COPRO riñón	0	0	0	0	0
URO riñón	0.31	0.32	0.12	0.2	0.41
PROTO riñón	0.31	0.3	0.068	0.27	0.35
Porfirinas en riñón	0.61	0.57	0.17	0.49	0.75
Máximo de excitación (riñón)	409.9	409.8	0.528	409.6	410.2
Porfirinas en orina (día 0)	0.83	0.91	0.29	0.61	1
Porfirinas en orina (día 25)	0.46	0.4	0.32	0.21	0.58
Porfirinas en orina (día 45)	0.58	0.43	0.35	0.25	0.98
Porfirinas en orina (día 56)	0.48	0.44	0.23	0.29	0.71
Máximo de excitación (día 0)	404.6	404.8	0.54	404	405.2
Máximo de excitación (día 25)	404.4	404.2	0.5	404.2	405
Máximo de excitación (día 45)	404.6	404.6	0.31	404.4	405
Máximo de excitación (día 56)	404.5	404.4	0.26	404.2	404.6
ALA en orina (día 0)	2.5	1.6	2.23	1.33	3.2
ALA en orina (día 25)	4.65	4.9	4.14	0.9	7.7
ALA en orina (día 45)	0.65	0	0.98	0	1.2
ALA en orina (día 56)	3.14	2.54	2.45	1.1	5.2
PBG en orina (día 0)	2.83	2.2	1.67	1.67	3.4
PBG en orina (día 25)	6.86	5.4	3.95	4.3	7.81
PBG en orina (día 45)	3.7	3.23	1.71	2.8	5.1
PBG en orina (día 56)	5.33	5.46	2.43	3.43	6.7

TABLA 18.- MEDIDAS DE CENTRALIZACION Y DISPERSION (GRUPO ALCOHOL + PLOMO)

	MEDIA	MEDIANA	Desv.estándar	Percentil 25	Percentil 75
Peso rata	228.2	226	18.5	210	243
Peso hígado	7.66	7.7	0.65	7.54	8.19
Peso hígado/Peso rata	0.034	0.034	0.0047	0.031	0.037
Peso riñón	2.33	1.8	1.59	1.69	2.2
ALA-D sangre	0.97	0.79	0.74	0.29	1.44
ALA-D activada sangre	13.27	13.52	3.12	9.92	16.05
PBG-D sangre	31.45	31.6	11.16	22.6	41
PPE	91.19	88.7	12.53	80.6	100.6
ZPP/PEL	1.38	1.35	0.072	1.33	1.44
Plumbemia	65.82	71.9	21.01	49.8	78.8
ALA-D hígado	0.15	0.16	0.022	0.13	0.18
ALA-D activada hígado	0.236	0.25	0.025	0.21	0.25
PBG-D hígado	0.132	0.13	0.017	0.12	0.146
ALA-S hígado	0.24	0.26	0.055	0.24	0.28
GSH hígado	1205.4	1209.3	178.6	1036	1304.5
Pb hígado	4.25	5.1	2.37	1.9	6.1
Zn hígado	84.49	81.5	9.16	77.9	88.68
Fe hígado	736.4	735.3	215.5	539.3	952.6
Cu hígado	14.64	12.3	3.67	11.7	17.32
ALA-D riñón	0.043	0.038	0.02	0.03	0.05
ALA-D activada riñón	0.096	0.1	0.022	0.072	0.11
PBG-D riñón	0.086	0.08	0.016	0.069	0.1
ALA-S riñón	0.34	0.34	0.03	0.32	0.36
Pb riñón	32.45	32.3	14.2	18.8	45.3
Zn riñón	65.29	62.5	10.79	56	74.5
Fe riñón	347.1	351.8	45.3	296.3	381.4
Cu riñón	21.1	20.5	9.47	12.4	25.2
Hematocrito	46.6	46	4.54	43	51
COPRO hígado	0.003	0	0.009	0	0
URO hígado	0.071	0.048	0.09	0.023	0.056
PROTO hígado	0.15	0.14	0.031	0.125	0.19
Porfirinas en hígado	0.23	0.23	0.1	0.15	0.24
Máximo de excitación (hígado)	411.7	411.6	0.52	411.2	412.2
COPRO riñón	0	0	0	0	0
URO riñón	0.24	0.22	0.074	0.2	0.29
PROTO riñón	0.43	0.41	0.1	0.34	0.54
Porfirinas en riñón	0.69	0.57	0.19	0.56	0.84
Máximo de excitación (riñón)	410.5	410.6	0.57	410.2	411
Porfirinas en orina (día 0)	0.66	0.62	0.35	0.27	0.96
Porfirinas en orina (día 25)	0.83	0.84	0.25	0.64	1.04
Porfirinas en orina (día 45)	0.74	0.71	0.17	0.63	0.91
Porfirinas en orina (día 56)	0.96	0.9	0.4	0.62	1.23
Máximo de excitación (día 0)	404.6	404.4	0.43	404.4	405
Máximo de excitación (día 25)	404.3	404.4	0.27	404	404.6
Máximo de excitación (día 45)	404	404	0.28	404	404.2
Máximo de excitación (día 56)	404.3	404.4	0.57	403.8	404.8
ALA en orina (día 0)	6.37	6	4.03	3.2	7.7
ALA en orina (día 25)	1.64	1.77	0.73	1.12	2.2
ALA en orina (día 45)	2.03	2.2	1.59	0	3.3
ALA en orina (día 56)	2.72	2.7	1.27	2.2	3.5
PBG en orina (día 0)	6.71	5.24	3.76	3.7	11.1
PBG en orina (día 25)	4.42	5.73	3.66	0.6	6.4
PBG en orina (día 45)	4.48	4.1	2.26	2.4	6.5
PBG en orina (día 56)	4.86	4.3	4.14	1.2	9.2

TABLA 19.- MEDIDAS DE CENTRALIZACION Y DISPERSION (GRUPO ALCOHOL + PLOMO + SAME)

	MEDIA	MEDIANA	Desv.estándar	Percentil 25	Percentil 75
Peso rata	260.4	262.5	15.55	247	270
Peso hígado	7.55	7.2	1.02	6.8	8.14
Peso hígado/Peso rata	0.029	0.0286	0.0023	0.027	0.03
Peso riñón	1.81	1.81	0.15	1.7	1.96
ALA-D sangre	1	0.88	0.39	0.73	1.46
ALA-D activada sangre	18.41	17.9	3.64	15.6	21.8
PBG-D sangre	43.97	40.2	16.36	31.2	55.3
PPE	81.73	74.3	18.98	72.3	75.7
ZPP/PEL	1.35	1.36	0.029	1.33	1.37
Plumbemia	77.24	75.3	27.5	71.5	75.9
ALA-D hígado	0.156	0.15	0.035	0.13	0.18
ALA-D activada hígado	0.25	0.24	0.017	0.236	0.26
PBG-D hígado	0.195	0.19	0.066	0.14	0.24
ALA-S hígado	0.174	0.16	0.07	0.12	0.23
GSH hígado	1309.8	1324.5	147.8	1276.6	1390.4
Pb hígado	3.72	3.26	1.99	1.62	5.91
Zn hígado	105.2	107.7	11.37	97.7	111.1
Fe hígado	647.3	617.8	95.99	587.8	692.2
Cu hígado	17.74	18.17	3.02	14.7	20.4
ALA-D riñón	0.027	0.027	0.015	0.013	0.041
ALA-D activada riñón	0.075	0.074	0.008	0.07	0.079
PBG-D riñón	0.135	0.14	0.046	0.089	0.18
ALA-S riñón	0.21	0.15	0.134	0.097	0.31
Pb riñón	25.5	24.1	11.42	14.8	36.4
Zn riñón	87.21	88.7	13.92	77.3	95.5
Fe riñón	287.2	293.2	29.73	261.8	307.1
Cu riñón	27.5	26.4	6.83	22.4	31.9
Hematocrito	44.2	44	1.39	43	45
COPRO hígado	0.0008	0	0.0025	0	0
URO hígado	0.037	0.03	0.023	0.02	0.058
PROTO hígado	0.154	0.13	0.038	0.14	0.18
Porfirinas en hígado	0.19	0.19	0.04	0.17	0.21
Máximo de excitación (hígado)	411.7	411.5	0.69	411.2	412.2
COPRO riñón	0.027	0	0.085	0	0
URO riñón	0.24	0.23	0.14	0.12	0.35
PROTO riñón	0.25	0.23	0.095	0.19	0.28
Porfirinas en riñón	0.52	0.48	0.24	0.34	0.64
Máximo de excitación (riñón)	410.2	410	0.64	409.6	410.8
Porfirinas en orina (día 0)	0.56	0.45	0.39	0.32	0.6
Porfirinas en orina (día 25)	0.39	0.36	0.26	0.16	0.58
Porfirinas en orina (día 45)	0.5	0.44	0.22	0.37	0.61
Porfirinas en orina (día 56)	0.44	0.36	0.26	0.23	0.55
Máximo de excitación (día 0)	404.8	404.8	0.41	404.6	405.3
Máximo de excitación (día 25)	404.5	404.4	0.17	404.4	404.6
Máximo de excitación (día 45)	404.9	404.9	0.28	404.6	405.2
Máximo de excitación (día 56)	404.5	404.7	0.53	404	405
ALA en orina (día 0)	3.74	2.46	3.71	1.03	5.5
ALA en orina (día 25)	1.46	0.87	1.67	0	2.5
ALA en orina (día 45)	2.61	2.4	2.3	0.5	4.9
ALA en orina (día 56)	3.56	1.9	5.75	0	2.8
PBG en orina (día 0)	5.46	4.85	2.27	4.5	5.7
PBG en orina (día 25)	3.84	4.1	1.7	2.5	5.5
PBG en orina (día 45)	3.34	3.87	1.46	2.9	4.2
PBG en orina (día 56)	4.27	3.7	1.95	2.91	6.22

Experimento 1: Resultados de la intoxicación crónica ~~por alcohol~~ y/o plomo

El uso del test de Kruskal-Wallis de comparación de medianas para más de dos grupos de tratamiento y los posteriores contrastes estadísticos, permitieron la determinación de la causa de las alteraciones observadas en algunos índices metabólicos estudiados tras la administración de los tóxicos alcohol y/o plomo.

Se consiguió una evidente intoxicación en el grupo tratado exclusivamente con plomo, al incrementarse de manera patente los niveles de este metal en sangre, hígado y riñón, con un nivel de significación de $p < 0.001$ en los tres casos. Como era de esperar, la administración exclusiva de etanol no modificó la concentración de plomo en los tejidos estudiados mientras que la administración simultánea de alcohol y plomo aumentó las tasas de este metal en sangre ($p < 0.001$), hígado y riñón ($p < 0.01$). No se encontraron diferencias significativas entre la concentración de plomo de los tres tejidos estudiados en el grupo que recibió alcohol+plomo respecto del que recibió plomo exclusivamente.

La levedad de la intoxicación saturnina quedó constatada por la inexistencia de anemia, y por la no modificación de la concentración urinaria, hepática o renal de porfirinas ni de la excreción de sus precursores en orina. Estos parámetros tampoco se modificaron en las intoxicaciones alcohólica o conjunta.

Las ratas que recibieron plomo, mostraron una elevada tasa de PPE, fenómeno bien conocido en el saturnismo y comentado en la introducción de esta tesis. Esta elevada protoporfirinemia no se debió a un aumento en la fracción de la PROTO quelada al zinc, pues el cociente ZPP/PEL no se modificó en relación con los controles.

La tasa de PPE se elevó ligeramente en el grupo intoxicado por etanol, sin alcanzar significación estadística. Sin embargo,

el cociente ZPP/PEL fue mayor en el grupo de ratas alcohólicas que en los controles ($p < 0.01$).

En la intoxicación conjunta, la concentración de PPE se incrementó considerablemente ($p < 0.01$ respecto del control) sin que existiese modificación del cociente ZPP/PEL. No se encontraron diferencias entre el grupo tratado con plomo respecto al tratado con etanol+plomo.

Uno de los marcadores bioquímicos más sensibles a la intoxicación por plomo es la actividad eritrocitaria de la enzima ALA-D. En este estudio, se observó una marcada hipoactividad sanguínea de esta enzima en el grupo tratado con el metal tóxico respecto del grupo control ($p < 0.001$). La actividad hepática también se vio inhibida pero en menor medida ($p < 0.05$). Por el contrario, no se observaron diferencias en la actividad específica de la enzima renal entre las ratas intoxicadas por plomo y las controles.

La actividad de la ALA-D sanguínea y hepática de ratas alcohólicas disminuyó respecto del control, aunque tal descenso no alcanzó significación estadística ($p < 0.1$). La intoxicación etílica tampoco indujo cambios en la actividad de la ALA-D renal.

En la intoxicación conjunta por plomo y etanol, la actividad de la ALA-D resultó muy inhibida en sangre ($p < 0.001$ *versus* control), e hígado ($p < 0.05$ *versus* control) sin que se viese alterada la actividad renal. La actividad de la enzima en los tres tejidos estudiados fue similar en el grupo de tratamiento con plomo y en el grupo que recibió alcohol+plomo.

La actividad máxima de la ALA-D, determinada tras la adición *in vitro* de Zn y DTT y referida como ALA-D activada, fue superior en el grupo tratado con plomo respecto del control en sangre ($p < 0.01$) y riñón ($p < 0.05$). Este mismo efecto se observó en la sangre de ratas que recibieron alcohol+plomo ($p < 0.001$). Sin embargo, tanto en la intoxicación saturnina como en la conjunta,

los valores de ALA-D activada en hígado no se mostraron significativamente diferentes al ser comparados con el grupo control. La determinación de la ALA-D activada en ratas alcohólicas, no reveló ninguna variación respecto a las determinaciones efectuadas en el grupo control.

La primera enzima limitante de la ruta metabólica del hemo, la ALA-S, mostró un efecto compensatorio en su actividad hepática, que se incrementó ($p < 0.05$ *versus* grupo control) tras la exposición al metal tóxico. Este efecto compensatorio no se observó en el tejido renal. En las ratas a las que se les administró alcohol, no se observaron cambios en la actividad hepática o renal de esta enzima.

La intoxicación simultánea con alcohol y plomo originó un aumento de la actividad hepática y renal de la ALA-S ($p < 0.05$) respecto a los controles.

La actividad de la PBG-D, considerada como segunda enzima limitante de la biosíntesis del hemo, no sufrió ninguna alteración tras la exposición a los tóxicos alcohol y plomo, administrados conjunta o separadamente, al no encontrarse diferencias respecto del grupo control en sangre, hígado o riñón.

La determinación de GSH hepático no reveló ninguna diferencia de concentración en las ratas tratadas con plomo respecto de las controles. El contenido GSH en hígado de rata alcohólica o intoxicada por alcohol+plomo disminuyó respecto de la constatada en el grupo control; sin embargo, no pudo apreciarse ninguna significación estadística.

Asimismo, la intoxicación por plomo no indujo modificaciones en la concentración hepática o renal de los metales esenciales zinc, hierro o cobre.

La concentración de hierro se incrementó significativamente ($p < 0.05$) en el hígado de ratas alcohólicas respecto de las

controles. No hubo diferencias en la tasa de Fe renal ni en la concentración en hígado o riñón de zinc o cobre.

En el grupo de intoxicación conjunta, el único metal esencial cuya concentración se modificó en tejidos fue la de zinc, cuyo contenido hepático se redujo significativamente respecto al grupo control y al tratado sólo con plomo ($p < 0.05$).

El cociente peso hígado/peso rata se mantuvo similar en todos los grupos de tratamiento estudiado, lo cual indica inexistencia de cambios macroscópicos en la estructura hepática.

Considerando globalmente todas las ratas de esta primera experiencia, los valores de plumbemia se correlacionaron significativamente tanto con la actividad eritrocitaria de la ALA-D ($r_s = -0.748$, $p < 0.001$) como con la tasa de PPE ($r_s = 0.753$, $p < 0.001$). En hígado y riñón, también se encontraron correlaciones significativas entre la concentración de plomo y la actividad tisular de la ALA-D ($r_s = -0.471$, $p < 0.001$ en hígado y $r_s = -0.256$, $p < 0.05$ en riñón). La concentración hepática de zinc, hierro o cobre no se correlacionó significativamente con la actividad hepática o renal de la ALA-D.

Experimento 2: Resultados de la terapia con SAME en la intoxicación crónica por alcohol

El SAME administrado por sí solo no modificó ninguna de las variables estudiadas en esta tesis, tras comparar sus valores con los resultados obtenidos en el grupo control.

Al comparar estadísticamente los resultados de las ratas tratadas con alcohol + SAME respecto a las que se les administró exclusivamente etanol, únicamente el valor de la ALA-D activada en riñón se modificó, al incrementar su valor en el grupo tratado con el fármaco ($p < 0.05$).

La administración de SAME a ratas alcohólicas, no modificó

la concentración hepática de hierro, que aparecía incrementada en las ratas alcohólicas del experimento 1. Sin embargo, la comparación de este parámetro respecto al grupo control tampoco ofreció diferencias significativas.

Experimento 3: Resultados de la terapia con SAMe en la intoxicación crónica por plomo.

El SAM no fue capaz de restaurar los valores de ALA-D sanguínea disminuidos ni de normalizar el resto de los parámetros biológicos alterados tras la exposición al metal tóxico. Sin embargo, el menor nivel de significación respecto del control constatado en este grupo en los valores de plumbemia ($p < 0.01$) y PPE ($p < 0.01$) en relación con el grupo que recibió plomo exclusivamente, indican una tendencia en la normalización de estos índices. El grupo tratado con plomo + SAM no mostró modificaciones relevantes en la actividad de la ALA-D hepática o renal.

La tasa de plomo en hígado mostró también una tendencia a la normalización en el grupo que además recibió SAMe ($p < 0.05$ respecto del control). En riñón, el SAMe no mostró ningún efecto sobre la concentración de plomo elevada en la intoxicación plúmbica.

La actividad hepática de la ALA-S, incrementada en el grupo intoxicado por plomo, se vio amortiguada tras el tratamiento con SAMe, efecto que no se pudo apreciar en tejido renal.

No se encontró ningún efecto significativo del fármaco utilizado sobre el hematocrito, la concentración urinaria o tisular de porfirinas ni sobre la excreción de sus precursores ALA y PBG, en relación con el grupo que recibió plomo. Tampoco se objetivó efecto alguno sobre la actividad de las enzimas del hemo o del resto de determinaciones no modificadas tras el periodo de intoxicación.

Experimento 4: Resultados de la terapia con SAME en la intoxicación crónica conjunta por plomo y etanol.

No se encontró efecto beneficioso alguno en la administración de SAME sobre la actividad de la actividad eritrocitaria, hepática o renal de la ALA-D, la tasa de PPE o la plumbemia; parámetros todos ellos alterados en la intoxicación conjunta.

La concentración hepática de zinc, disminuída en el grupo de intoxicación conjunta respecto del grupo control y del grupo tratado con plomo exclusivamente ($p < 0.05$), aumentó significativamente mediante el tratamiento con SAME en el grupo de tratamiento que recibió plomo + alcohol + SAME, equiparándose sus valores a los controles.

La administración de SAME a ratas intoxicadas con ambos xenobióticos amortiguó la hiperactividad compensatoria de la ALA-S hepática y renal. La actividad de la PBG-D en los tres tejidos estudiados no se modificó significativamente.

El resto de las determinaciones analíticas estudiadas no sufrieron ninguna modificación significativa en el grupo al que se le administró plomo + alcohol + SAME.

DISCUSSION

CAPITULO XII.- DISCUSION

Concentración de plomo en sangre y tejidos

La intoxicación subclínica por plomo es un fenómeno cada vez más usual en las sociedades industriales, dado que es un metal ampliamente distribuido en el medio ambiente y que es capaz de inducir toxicidad incluso a muy bajas concentraciones (Hernberg y Nikkanen 1970). Hemos conseguido reproducir en nuestro modelo experimental una leve pero evidente intoxicación, como revelan las tasas de plomo alcanzadas en sangre, hígado y riñón (Figuras 19, 20 y 21) en el grupo que recibió exclusivamente este metal. La inexistencia de anemia y los niveles normales de porfirinas y precursores en orina revelan la levedad de la intoxicación saturnina. Estos resultados concuerdan con los de otros autores (Fujita y cols 1981; Gelman y cols. 1978) que no encontraron anemia en ratas adultas expuestas al plomo con plumbemias inferiores a 100 µg/Dl.

Magid y Hilden (1975) propusieron que una alteración del hepatocito de cualquier etiología podría afectar la capacidad del hígado de excretar plomo a través de la bilis. Grilo y cols. (1990) encontraron plumbemias mayores en bebedores habituales, con o sin hepatopatía, en relación con la población sana o enfermos no bebedores. Por otra parte, algunos autores han sugerido la posibilidad de que el alcohol aumente la absorción intestinal de plomo (Mahaffey y cols. 1974) y otros (Bortoli y cols. 1986) han descrito intoxicaciones debido al alto contenido de plomo de algunas bebidas alcohólicas.

Ha habido autores que han sugerido la posibilidad de que el etanol actúe redistribuyendo los depósitos corporales de plomo. Telisman y cols. (1984) comprobaron que, tras una ingesta aguda de alcohol en sujetos con altos índices de plomo sanguíneo, aumentaba la plumbemia y la tasa de plomo urinario. Es presumible que el alcohol produjese su efecto fundamentalmente sobre la distribución del plomo en hígado, órgano que metaboliza la gran

mayoría del alcohol ingerido. Sin embargo, Flora y Tandon (1987), aunque describieron efectos aditivos de ambos tóxicos sobre la concentración de plomo en sangre en la intoxicación crónica experimental, no objetivaron ninguna diferencia en los niveles hepáticos del metal. En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas en las tasas de este metal en sangre, hígado o riñón en el grupo de ratas intoxicado exclusivamente con plomo respecto al tratado con etanol y plomo simultáneamente, por lo que deducimos que en la intoxicación crónica podría darse un aumento en la tasa de deposición del metal tóxico en el hueso, órgano que mantiene el *pool* de plomo fisiológicamente inactivo frente a la acción nociva de otros tóxicos como el etanol o incluso frente a la acción de quelantes utilizados con fines terapéuticos.

El uso de agentes quelantes como el EDTA, la D-penicilamida o los dimercapto derivados ha sido y es práctica habitual en el tratamiento de la intoxicación plúmbica (Aposhian y Aposhian, 1990). En un reciente estudio realizado en nuestra unidad, (Sánchez-Fructuoso y cols. 1993) observábamos que tras un tratamiento quelante con EDTA, los niveles de plumbemia tornaban a sus valores normales, mientras que la concentración ósea de plomo se mantenía. Esta persistencia de la concentración de plomo en hueso traduce la potencial peligrosidad del saturnismo crónico aparentemente corregido.

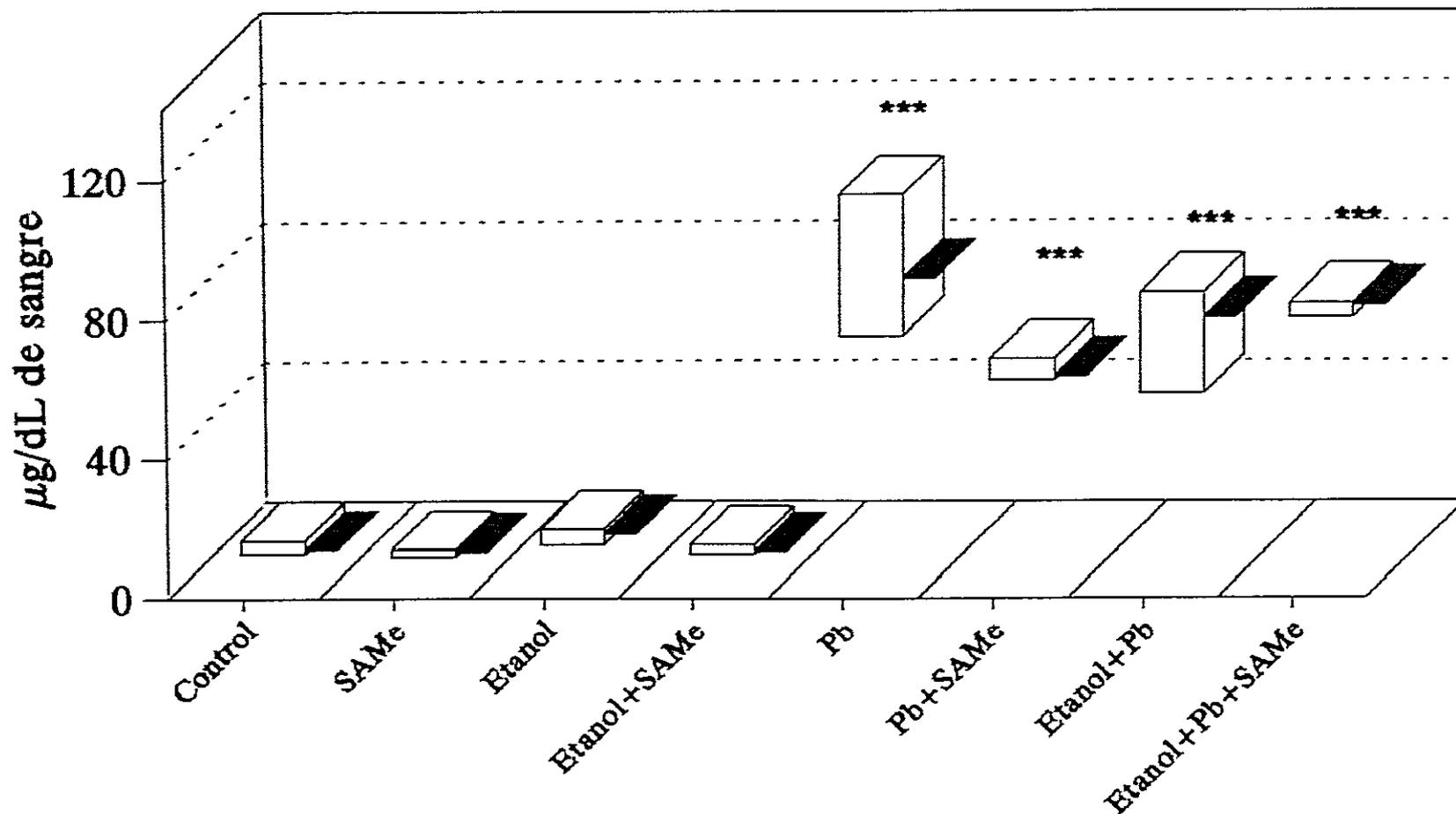
Mediante la terapia con SAME, nos hemos propuesto un acercamiento diferente y no necesariamente excluyente a la utilización de quelantes en el tratamiento del saturnismo.

Dhawan y cols. (1989), tras utilizar diferentes quelantes en la intoxicación separada y conjunta con plomo y/o etanol, sugerían la necesidad de utilizar un tratamiento suplementario que mejorara la función hepática en la intoxicación por ambos xenobióticos. En este sentido, el SAME podría actuar normalizando el metabolismo hepático previamente dañado.

El grupo argentino de investigación en porfirinas utilizó SAME en el tratamiento del saturnismo experimental crónico o agudo (Batlle y cols. 1986). Constataron una importante disminución en las tasas del metal tóxico en sangre, hígado y riñón, y atribuyeron este efecto al aumento de la concentración de GSH inducida tras la administración de SAME. El GSH actuaría favoreciendo la excreción biliar de plomo a través de la formación de un conjugado con el metal.

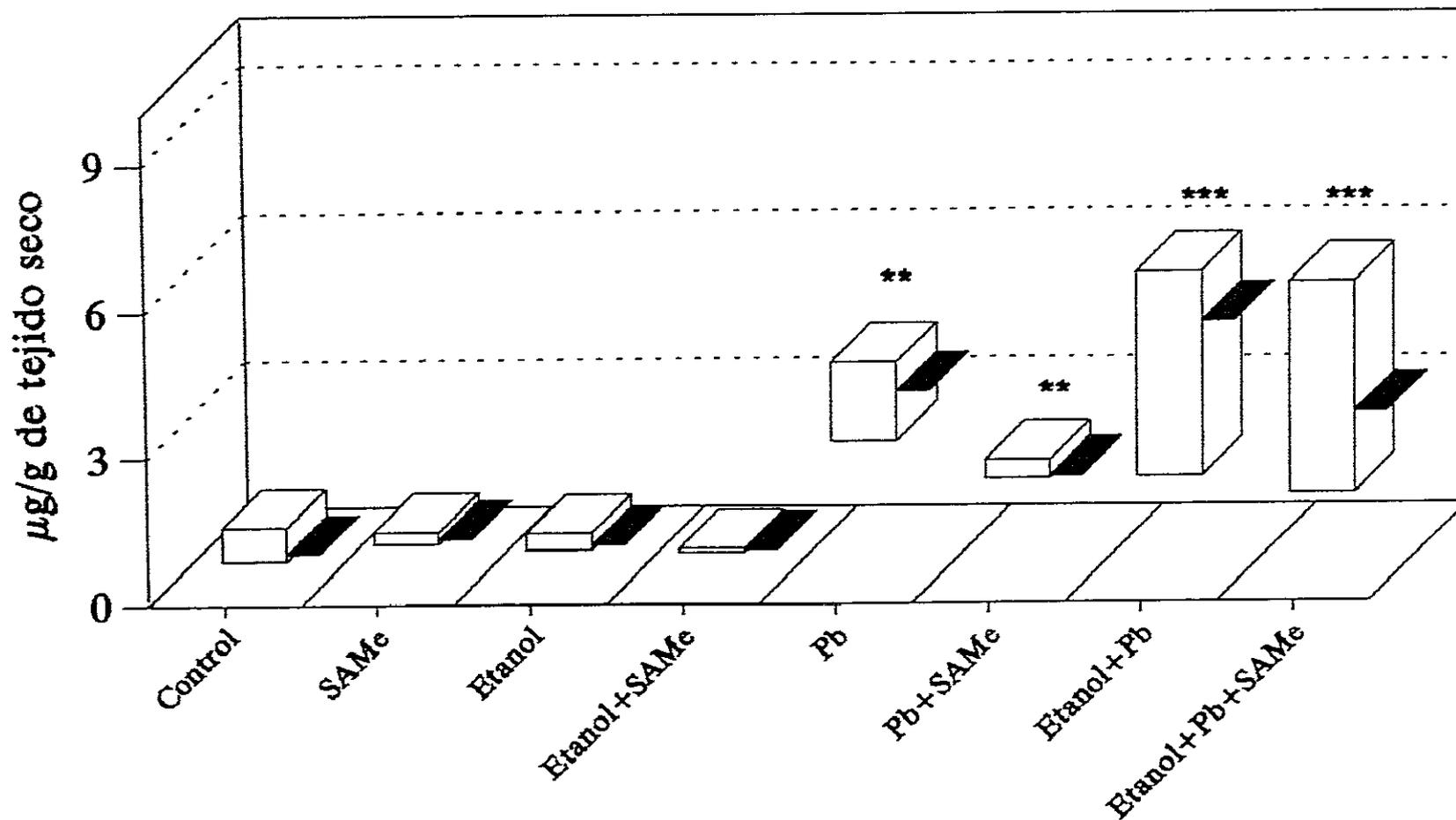
En experiencias previas realizadas en nuestro laboratorio (Muñoz y cols. 1994), habíamos constatado que una terapia con SAME administrado intraperitonealmente disminuía los niveles de plomo sanguíneos. Sin embargo, en el presente estudio no hemos encontrado diferencias importantes en la tasa de plomo en sangre, hígado o riñón en los grupos tratados con SAME respecto de los grupos intoxicados por ambos xenobióticos administrados separada o conjuntamente. No obstante, sí hemos objetivado un descenso casi significativo ($p < 0.1$) de la tasa de este metal pesado en sangre e hígado tras la terapia con SAME en el saturnismo crónico experimental. Esta observación no se vió acompañada en nuestra experiencia por un descenso del contenido hepático del tripéptido GSH, como describían Batlle y cols. (1986). Por otra parte, el efecto del plomo sobre la concentración de GSH no ha sido aún dilucidado (Kewata y Suzuki 1983; Leeming y Donaldson 1984; Flora y Tandon 1987).

Figura 19.- Plomo en sangre



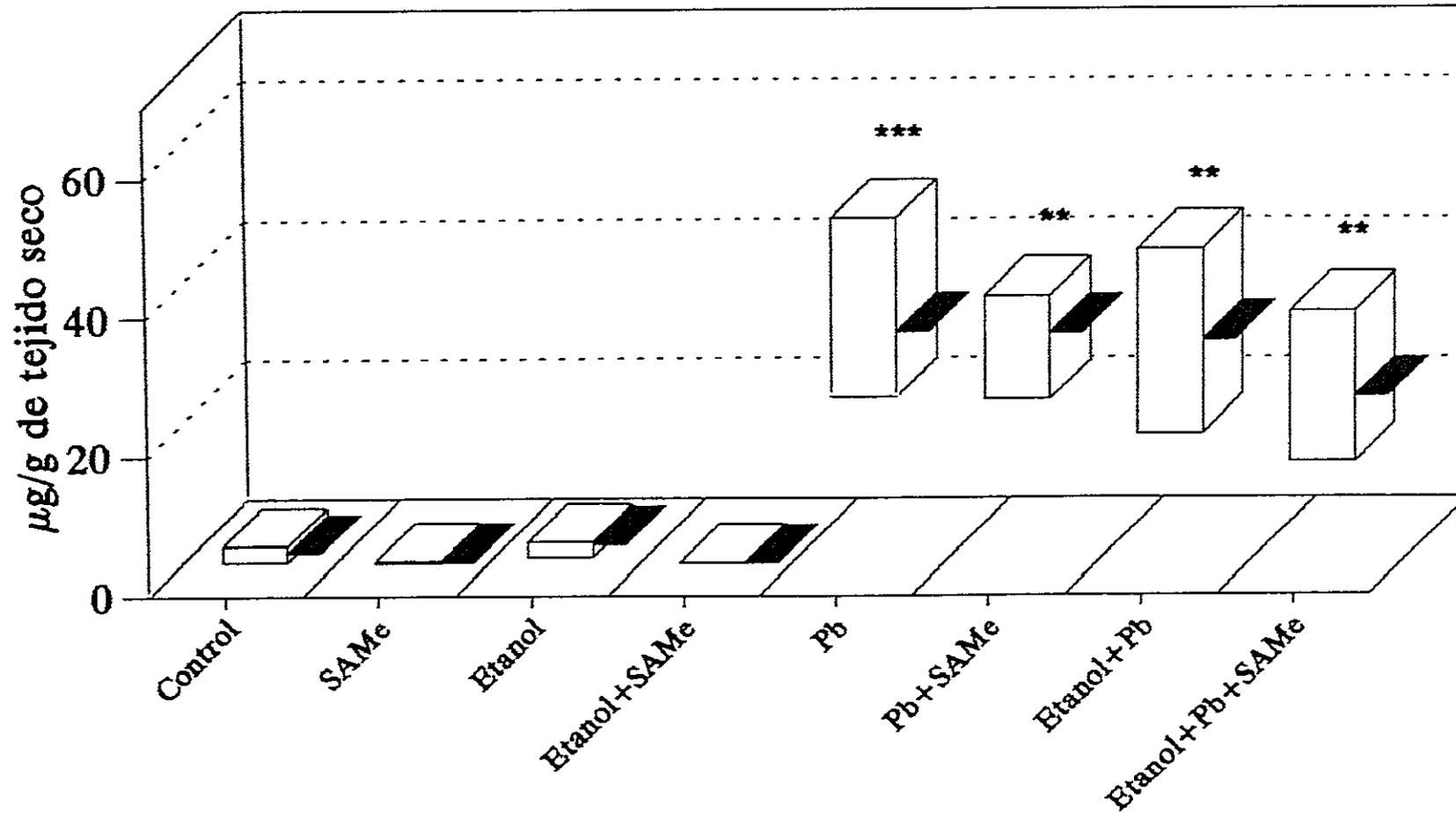
***: $p < 0.001$ vs Control

Figura 20.- Plomo en hígado



** , ***: $p < 0.01$, $p < 0.001$ vs Control

Figura 21.- Plomo en riñón



** , ***: $p < 0.01$, $p < 0.001$ vs Control

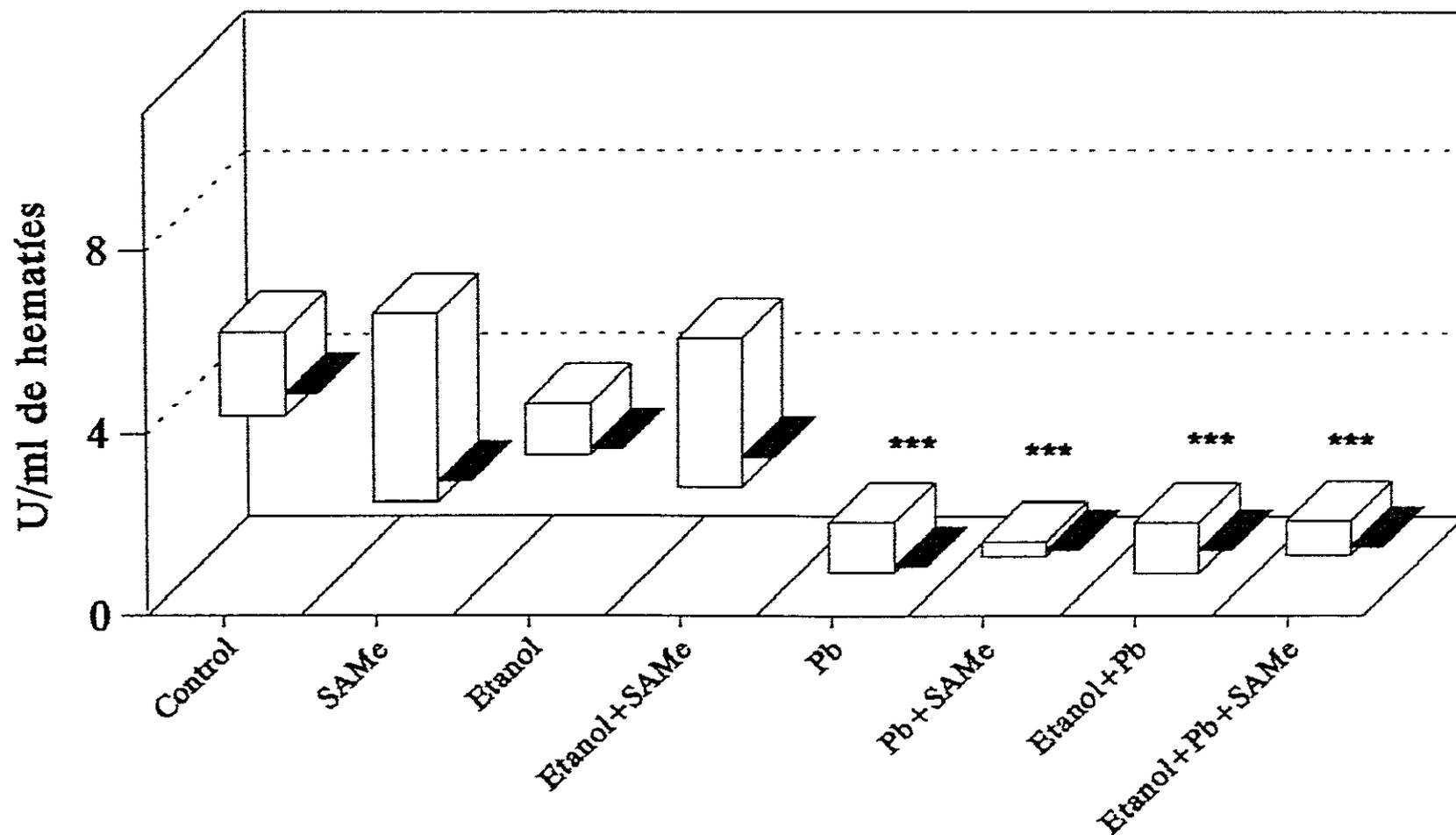
Actividades enzimáticas de la ruta del hemo

La influencia que el plomo ejerce sobre la ruta metabólica del hemo es un hecho bien conocido y caracterizado. Especialmente sensible a este efecto tóxico del plomo es la enzima ALA-D; esta enzima contiene un átomo de zinc y 8 grupos sulfidrilos, y resulta inhibida al quedar el zinc desplazado por el plomo (Moore 1986).

La actividad eritrocitaria de esta enzima ha sido utilizada como marcador de detección precoz del saturnismo (Hueso y cols. 1989) debido a su alta sensibilidad. En nuestra experiencia, la administración de plomo a ratas, efectivamente redujo de manera muy significativa la actividad de la ALA-D globular (Figura 22). Este efecto ha sido ampliamente recogido en la literatura científica, tanto en la intoxicación aguda como en la crónica, tal y como ha quedado descrito en el capítulo de Introducción.

La actividad hepática y renal de la ALA-D en la intoxicación plúmbica, no parece seguir el patrón de la ALA-D eritrocitaria. La actividad de la ALA-D en riñón no se modificó de forma significativa tras la adición del metal tóxico en el agua de bebida de los animales de experimentación. Fowler y cols. (1980) verificaron ya que las ratas expuestas al plomo no mostraban actividad deprimida de la ALA-D renal, aunque este mismo autor (Fowler y cols. 1987a) describía esta enzima como susceptible de ser inhibida por el plomo *in vitro*. El hecho de la no inhibición de la enzima en riñón, podría ser explicado por la presencia de la Zn-metalotioneína renal, proteína inducible que tiene un efecto detoxificador al ligar plomo a través de grupos sulfidrilos contenidos en restos de cisteína (Goëring y Fowler 1987). También se ha demostrado la acción de la Zn-tioneína como reservorio y donador de zinc. Este metal es considerado esencial para la actividad catalítica de la ALA-D, por lo que se considera que la Zn-tioneína actuaría favoreciendo la actividad enzimática de la ALA-D.

Figura 22.- Actividad de la ALA-D eritrocitaria

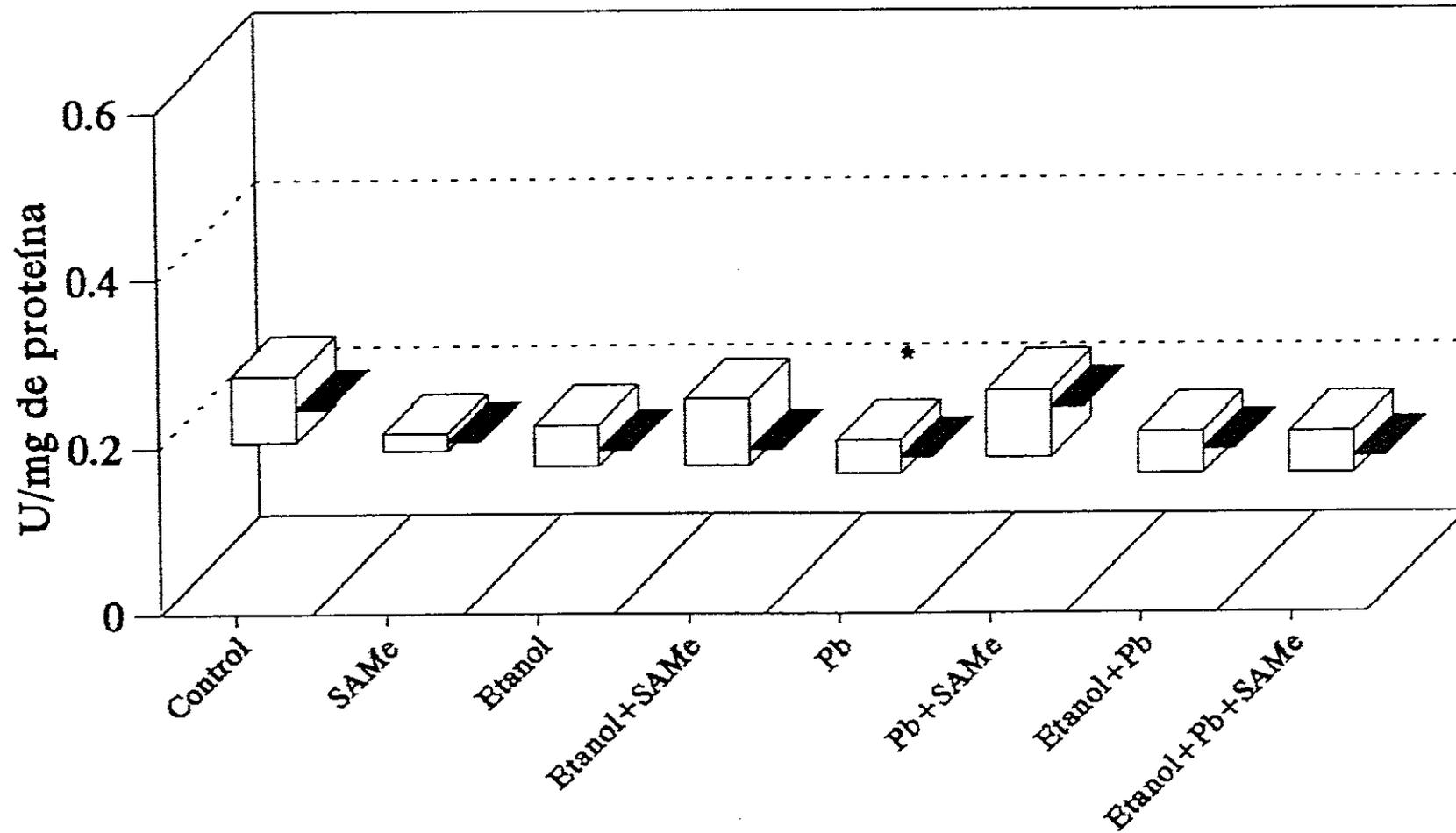


***: $p < 0.001$ vs Control

Es bien conocido el efecto inhibitorio que la administración aguda de plomo ejerce sobre la actividad de la ALA-D hepática. Sin embargo, Alvares y Kappas (1979), no encontraron alteraciones en la porfirinosíntesis hepática tras la administración crónica de este metal. Por otra parte, Goëring y Fowler (1987b) también caracterizaron la proteína Zn-tioneína hepática como factor protector de la ALA-D en la intoxicación por plomo. En nuestro modelo experimental, encontramos una ligera disminución de la actividad de la ALA-D hepática, mucho menor que la encontrada en la enzima eritrocitaria (Figura 23). Es destacable reseñar que la concentración hepática de zinc en este grupo de animales de experimentación sufrió un descenso leve pero significativo (Figura 27). Este hecho podría indicar una menor efectividad de la Zn-tioneína hepática respecto a la renal en su capacidad de ceder el zinc necesario para una normal actividad de la ALA-D.

La actividad sanguínea, hepática o renal de la enzima ALA-D no se modificó significativamente en el grupo de ratas crónicamente intoxicadas con etanol respecto del grupo control, aunque en el hígado y en la sangre sufrió un descenso casi significativo de su actividad (Figuras 22 y 23). En un estudio *in vitro*, Telisman y cols (1984) no observaron ninguna modificación en la actividad eritrocitaria de esta enzima en presencia de etanol. Sin embargo, existen suficientes evidencias que indican que el consumo de etanol afecta la actividad de esta enzima (McColl y cols. 1980; McColl y cols. 1981). En estos estudios ya se indica la diferencia entre la intoxicación crónica y aguda por etanol, observándose un efecto de recuperación en la actividad de la enzima en la intoxicación crónica. Según describieron Solomon y Crouch (1990), es el acetaldehído, metabolito reactivo del etanol, el responsable directo del efecto inhibitorio observado en la ALA-D. No obstante, el exceso fisiológico de esta enzima y su recuperación en la exposición crónica al tóxico, no permite, en nuestra opinión, definir esta enzima como posible marcador de intoxicación por etanol, tal y como propusieron Sieg y cols (1991).

Figura 23.- Actividad de la ALA-D en hígado



*: $p < 0.05$ vs Control

No observamos ninguna diferencia significativa entre la actividad de esta enzima en el grupo intoxicado con ambos tóxicos simultáneamente respecto del grupo expuesto únicamente al metal tóxico. Telisman y cols. (1984) al estudiar sujetos controles sanos y trabajadores expuestos al plomo, observaron un paralelismo entre el descenso en la actividad de la ALA-D eritrocitaria y el aumento de la plumbemia observado en las dos horas siguientes a una ingestión aguda de etanol. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con la teoría de que el plomo es un inhibidor de lenta unión al sitio activo de la enzima (Tsukamoto y cols. 1980). En otros dos estudios muy similares entre sí (Miniuk y cols. 1989; Flora y Tandon 1987), se estudió la intoxicación crónica conjunta por plomo y alcohol en un modelo experimental que administraba el etanol en el agua de bebida. Estas dos investigaciones describen un aumento de los niveles de plomo en sangre tras la exposición a ambos xenobióticos. Sin embargo, también describen un difícilmente explicable aumento de la actividad globular de la ALA-D en el grupo de intoxicación por alcohol + plomo respecto del grupo que recibió únicamente plomo como agente tóxico.

El tratamiento con SAME no logró recuperar la actividad deprimida de la ALA-D eritrocitaria tras la intoxicación por plomo o por alcohol + plomo. Sin embargo, sí normalizó la actividad hepática de esta enzima en el grupo expuesto al plomo. Este efecto podría explicarse por el hecho de que el SAME es un donador de grupos tiólicos que actuaría favoreciendo la catálisis enzimática bien de forma directa o bien contribuyendo al mantenimiento de los niveles de moléculas ricas en grupos tiólicos como son el GSH o la metalotioneína. En un estudio de Batlle y cols. (1986), la administración de SAME a ratas con intoxicación saturnina revertía esta inhibición de la enzima eritrocitaria al tiempo que normalizaba la plumbemia. A la vista de los resultados obtenidos en nuestras investigaciones, no existen datos que indiquen que el SAME tenga capacidad de normalizar la actividad de la ALA-D sanguínea ni de disminuir la tasa de plomo en sangre con la misma eficacia que un quelante,

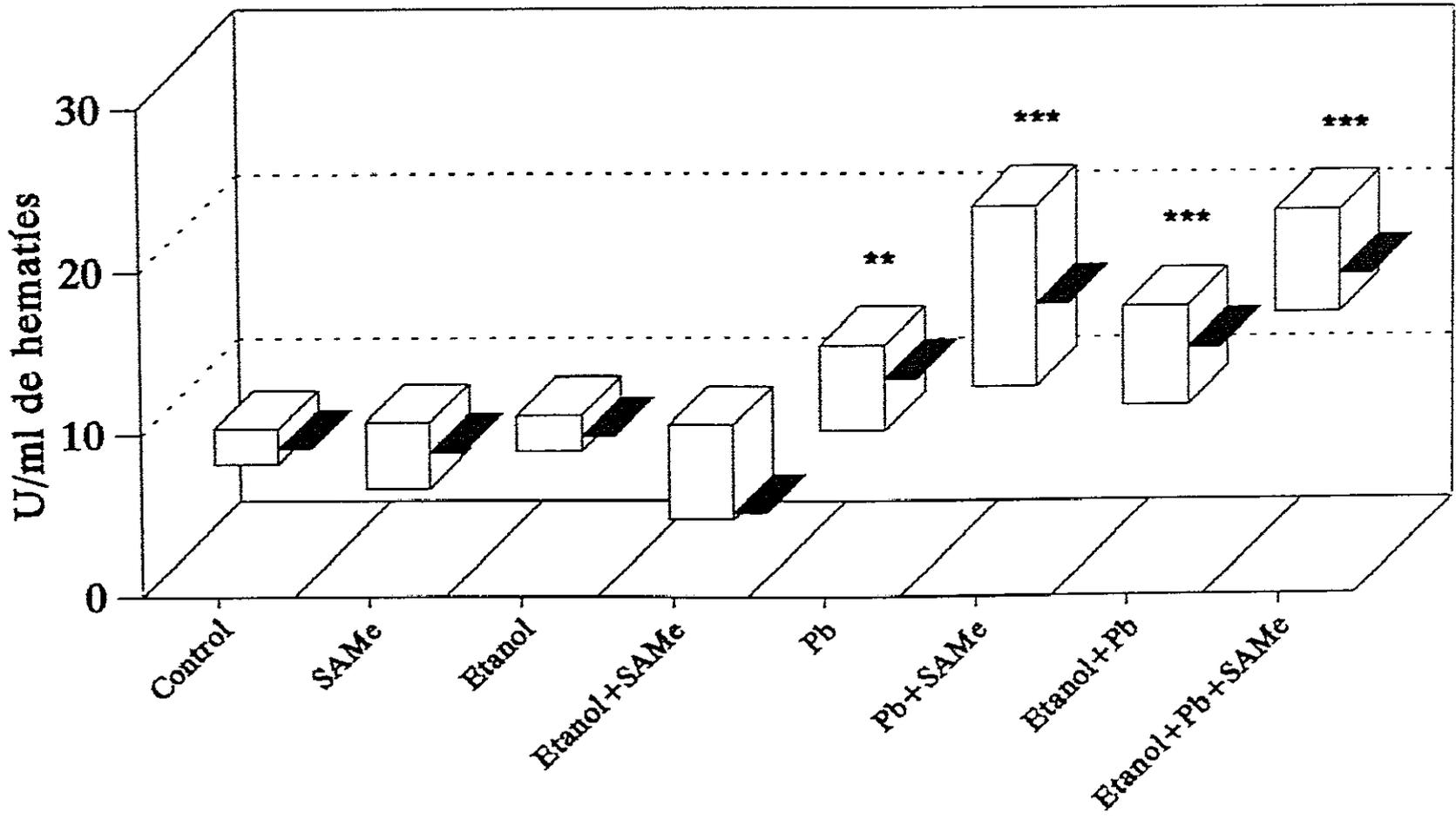
aunque podría actuar directamente sobre la actividad de la enzima presente en el hígado, como ya sugerimos en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio (Muñoz y cols. 1994).

La relación entre niveles de plomo en sangre y la actividad de la ALA-D eritrocitaria sigue una curva exponencial negativa (Meredith y cols. 1979), ya que la enzima queda rápidamente inhibida con muy bajas concentraciones del metal tóxico. Al considerar todas las ratas del experimento 1 como un total observamos una estrecha correlación ($r_s = -0.748$) que confirma los resultados obtenidos por Meredith y cols., si bien en esta correlación se obvia el posible efecto del etanol sobre la actividad de la ALA-D globular.

Aunque el plomo inhibe la actividad de la ALA-D, actúa como activador de su síntesis, como demostraron Fujita y cols. en 1981 utilizando técnicas de radioinmunoensayo. *In vitro*, la adición al medio de incubación de zinc y DTT en el ensayo enzimático, permite determinar la capacidad catalítica máxima de la enzima, a la que nos referiremos como "ALA-D activada". En nuestra experiencia, el valor de este parámetro se incrementó significativamente en los grupos de ratas que recibieron plomo (independientemente de la ingesta de alcohol) respecto del grupo control, lo cual confirma la hipótesis de una mayor síntesis objetivada tras la exposición plúmbica.

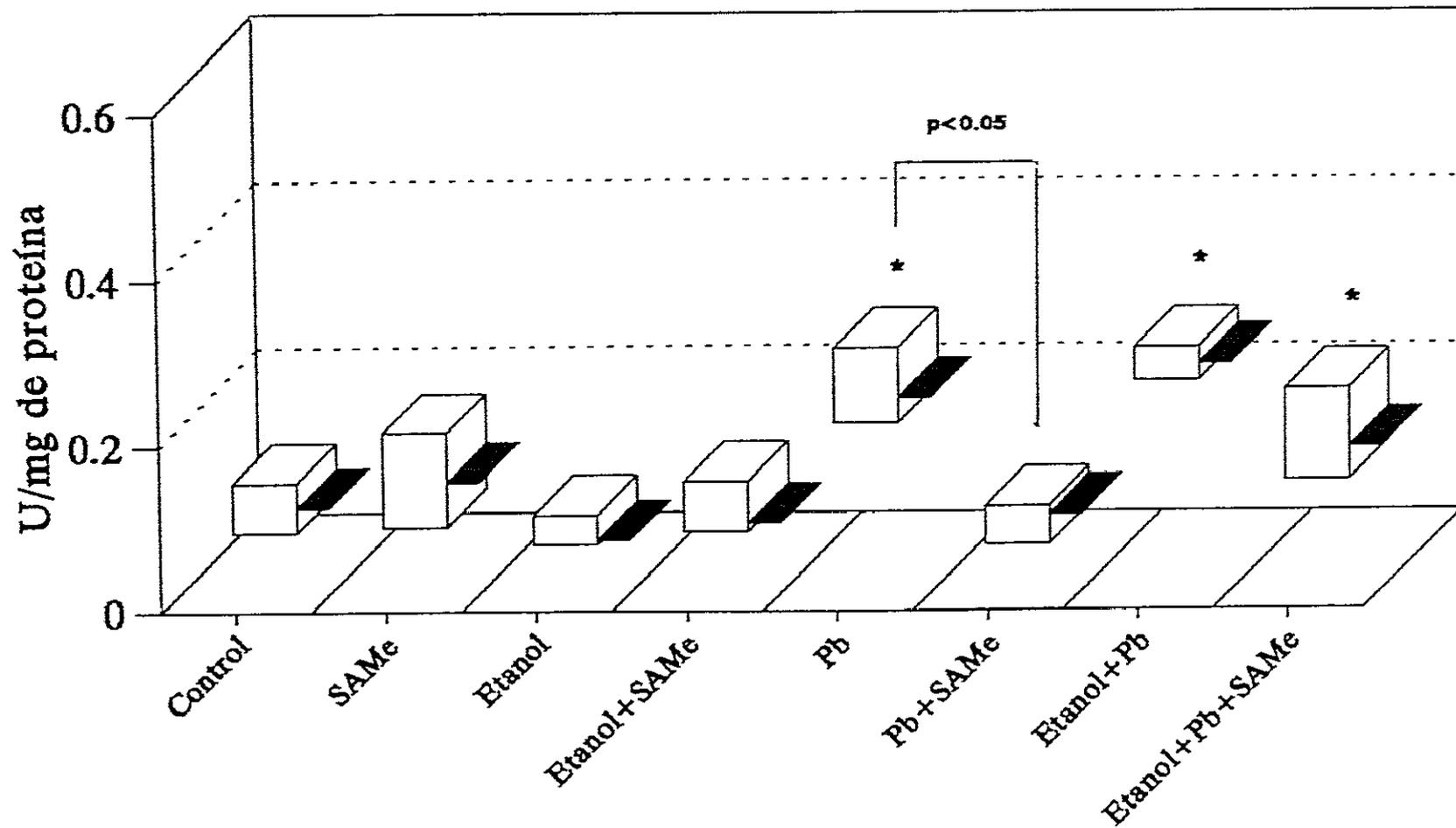
Al igual que otros autores (Maxwell y Meyer 1976) hemos objetivado un aumento en la actividad hepática de la ALA-S (Figura 25) en el grupo de ratas al que se le administró plomo en el agua de bebida. Este efecto podría ser debido tanto a un aumento compensador ocasionado por el déficit de hemo como por un aumento de la enzima HEMO-OX que inicia su degradación. En la intoxicación conjunta por alcohol y plomo, se observó el mismo efecto, ya que ambos tóxicos han sido descritos como inductores de la actividad de esta enzima. En este sentido, no hemos observado ningún fenómeno de sinergia o potenciación en la acción de ambos tóxicos sobre la actividad de la ALA-S.

Figura 24.- ALA-D activada eritrocitaria



** , ***: p<0.01, p<0.001 vs Control

Figura 25.- Actividad de la ALA-S en hígado



*: $p < 0.05$ vs Control

La administración de SAME logró amortiguar la hiperactividad compensatoria inducida en la ALA-S tras la exposición al plomo, al actuar sobre las moléculas ricas en grupos tiólicos que mantienen estable la actividad de la ALA-D, normalizando así la ruta metabólica del hemo en el hígado. Sin embargo, en la intoxicación por alcohol y plomo, el SAME no estabilizó la actividad hepática de la ALA-S, probablemente debido al efecto desestabilizador del etanol sobre el cociente NADH/NAD, y sobre la actividad del citocromo P450, hecho éstos que afectan indirectamente a la actividad de esta enzima (Labbe y cols. 1970).

La PBG-D, enzima considerada como segundo punto limitante de la ruta tras la ALA-S (Moore 1986), no sufrió modificaciones significativas de su actividad en sangre, hígado o riñón en ninguno de los grupos estudiados. Este hecho pone de manifiesto la pretendida levedad de la intoxicación a la que fueron sometidos los animales de experimentación, ya que sólo fue capaz de inducir cambios compensatorios en la actividad de la ALA-S.

Es reseñable el hecho de que en los pocos trabajos existentes sobre intoxicación conjunta por plomo y alcohol publicados, el método empleado para la intoxicación alcohólica fue el poco eficiente de añadir etanol en el agua de bebida. Además, estos estudios se han publicado en revistas de poca difusión y que han podido ser conseguidos gracias a los modernos medios existentes de documentación bibliográfica.

Contenido hepático de GSH

En el alcoholismo crónico, la hipótesis más aceptada es la que postula que existe una pérdida en el contenido hepático de GSH debido a la formación de aductos del etanol con el tripéptido (Viña y cols. 1980). Sin embargo se han publicado trabajos en los que la concentración de GSH resulta inalterada o incluso aumenta tras la intoxicación crónica (Fernández-Checa 1989). Es bien sabido que los grupos tiólicos presentes en el GSH son necesarios

para el mantenimiento de la actividad de la mayoría de las enzimas de la ruta del hemo que contienen grupos -SH en su centro activo y en especial de la actividad de la ALA-D hepática. El discreto descenso, no significativo, de la actividad de la ALA-D hepática podría ser una consecuencia de la acción tóxica directa del acetaldehído sobre la ALA-D y al relativo descenso, no significativo, de la concentración hepática de GSH medida en nuestras ratas alcohólicas (Figura 26).

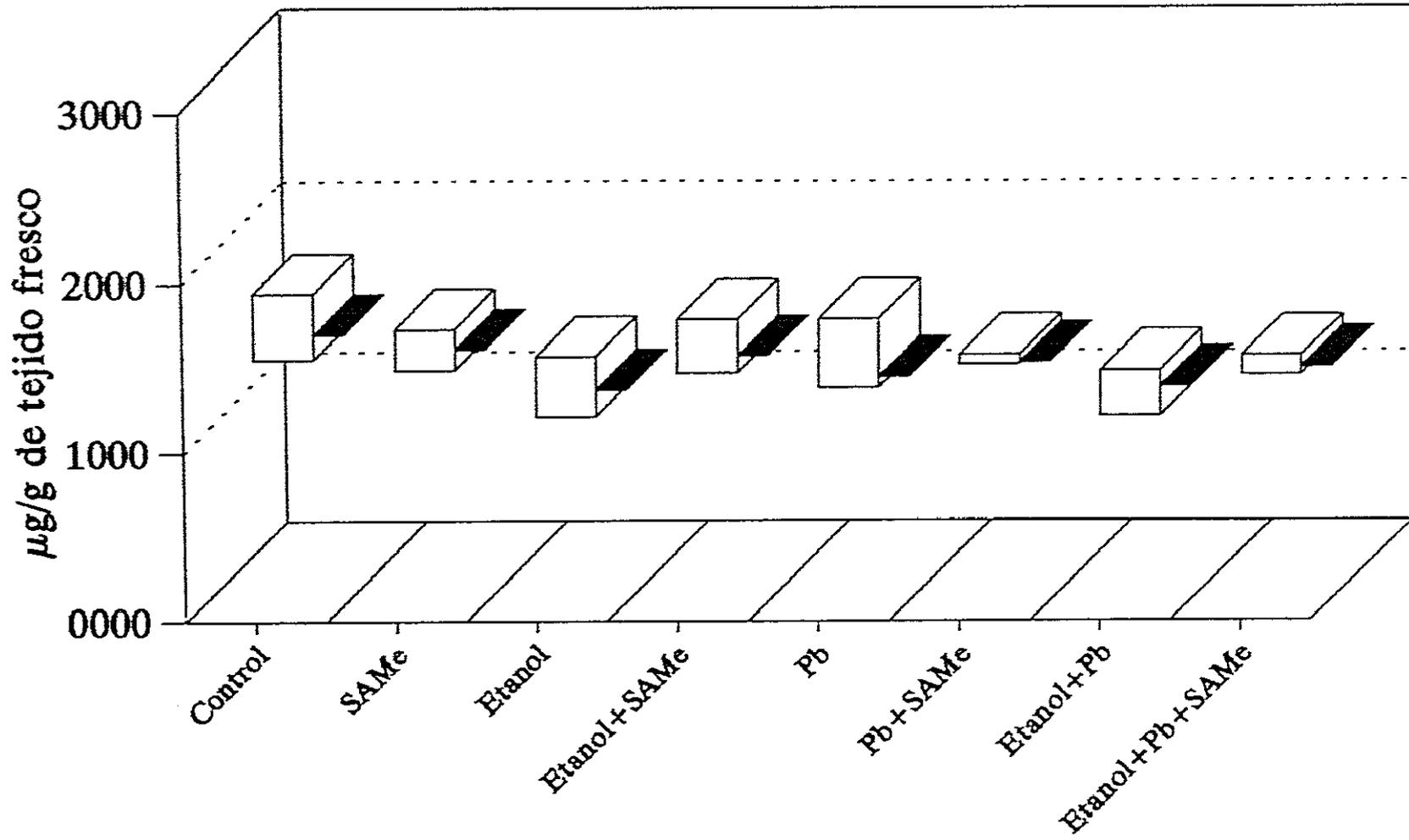
Según Batlle y cols. (1986), el plomo administrado a ratas de manera aguda o crónica produce una disminución de la concentración de GSH en hígado debido a la formación de un conjugado GSH-plomo que favorecería a su vez la eliminación del metal vía biliar. Nuestros resultados no muestran diferencia significativa alguna en la tasa de plomo en hígado ni en el contenido de GSH en dicho órgano, probablemente debido a la levedad de la intoxicación. No obstante, otros autores (Flora y Tandon 1987) encuentran un aumento de la concentración de GSH hepático tras la consecución de un modelo de saturnismo crónico experimental y explican este efecto como un lógico mecanismo compensatorio.

Estos mismos autores encontraron en la intoxicación conjunta por plomo y etanol concentraciones del tripéptido hepático similar al objetivado en su grupo de ratas controles e inferior al medido en su grupo que recibió plomo como único agente tóxico. Sin embargo, los resultados reflejados en esta tesis muestran un contenido de GSH en hígado similar al observado en el grupo alcohólico; es decir, mostraron un leve descenso en relación con la concentración calculada en el grupo control. La observación de Flora y Tandon (1987) resulta difícil de explicar teniendo en cuenta que no es probable que el plomo y el etanol ejerzan acciones antagónicas sobre la tasa de GSH en hígado ya que en ambos casos el efecto se ve mediado por la formación de conjugados de GSH con el xenobiótico, bien sea el plomo o el acetaldehído.

Intentando establecer algún paralelismo con nuestras experiencias, hemos revisado los estudios que examinan un posible efecto sinérgico de dos hepatotoxinas como el cadmio y el etanol sobre el metabolismo hepático. Es notorio señalar la gran diversidad de resultados encontrados en estos trabajos; Sharma y cols. (1991) encuentran que la exposición con ambos tóxicos deprime significativamente la concentración de GSH hepático y la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo antioxidativo, y un aumento de la peroxidación lipídica. Por el contrario, Hopf y cols. (1990) no observan este efecto sinérgico e incluso Kershaw y cols. (1990) postulan que el etanol podría disminuir la hepatotoxicidad del cadmio en la intoxicación aguda al reducir la interacción del cadmio con sus centros de acción tóxica como orgánulos citoplasmáticos y proteínas de alto peso molecular.

La administración de SAME, molécula fisiológica precursora de la síntesis de GSH en hígado, no varió significativamente la tasa hepática de este compuesto tras la intoxicación por alcohol y/o plomo. Al no encontrar grandes descensos en la tasa hepática del tripéptido, no es probable que el exceso de SAME se desvíe hacia la ruta de transulfuración teniendo en cuenta el gran número de reacciones enzimáticas en las que el SAME interviene como cofactor enzimático (Stramentinoli 1987).

Figura 26.- Contenido hepático de GSH



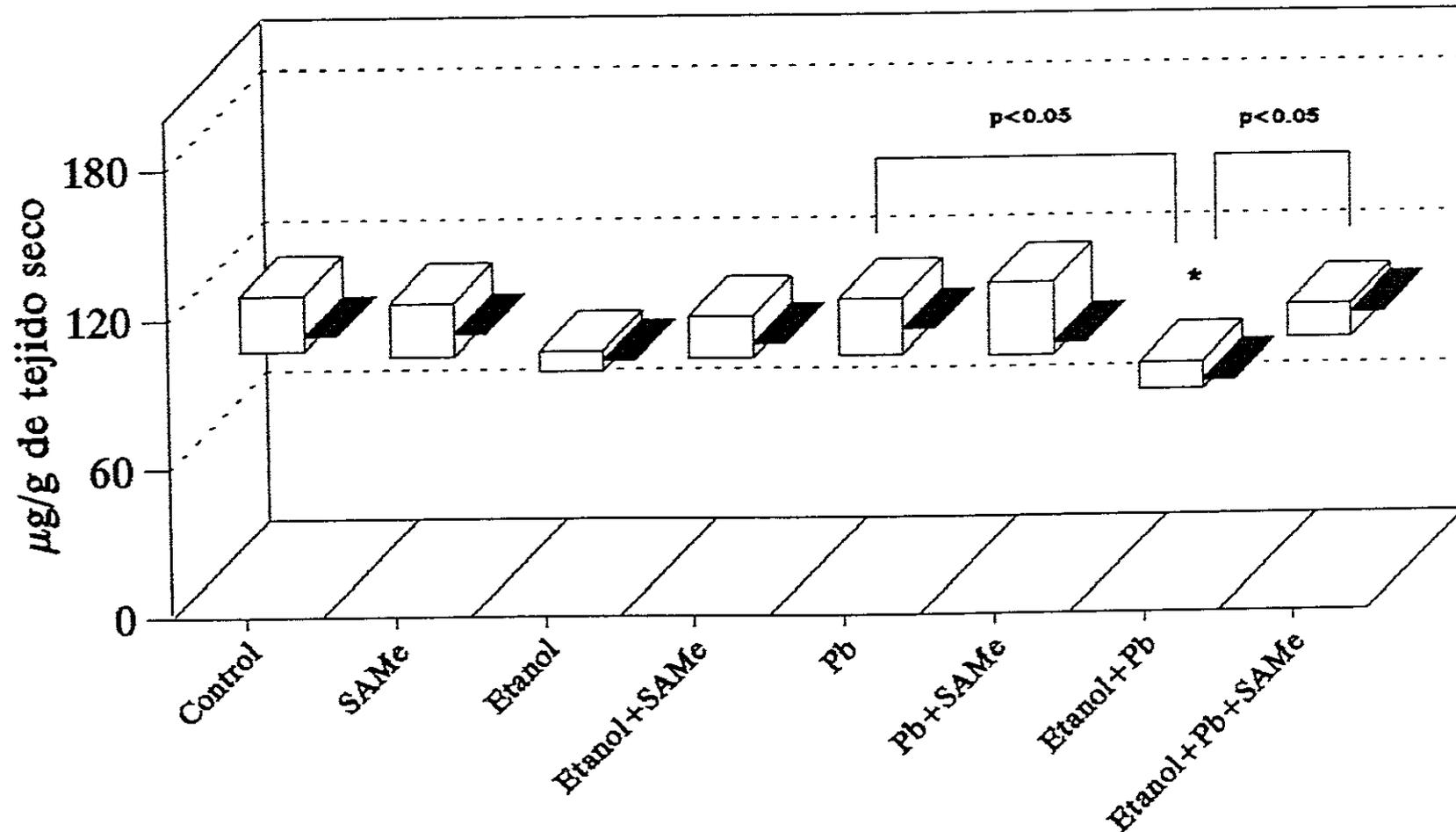
Concentración de metales esenciales en hígado y riñón

Dhawan y cols. (1992) objetivaron en ratas expuestas al plomo y pretratadas con etanol una mayor eliminación de algunos metales esenciales como el calcio o el magnesio, al tiempo que constataban una disfuncionalidad hepática objetivada por la aparición de especies reactivas de oxígeno que se reflejan en el fenómeno degenerativo de la peroxidación lipídica. Hemos estudiado en nuestras investigaciones el efecto tóxico del alcohol y/o plomo sobre la concentración hepática o renal de ciertos metales esenciales como el zinc, hierro o cobre que pudieran tener relación con otros índices bioquímicos estudiados en esta tesis.

Hemos encontrado en el grupo de ratas intoxicado simultáneamente con plomo y etanol un descenso significativo de la tasa hepática de zinc en relación con el grupo control y con el grupo que recibió exclusivamente plomo como agente tóxico (Figura 27), por lo que podría deducirse un posible efecto sinérgico de ambos tóxicos sobre el valor de este parámetro. La importancia del zinc es decisiva en la actividad de la enzima ALA-D pues actúa como cofactor enzimático en competencia con el plomo por el sitio activo de la enzima. Esta deficiencia de zinc en el hígado podría explicar en parte la hipoactividad de la enzima ALA-D inducida por el plomo. Sin embargo, la relación entre la tasa de zinc en hígado y la actividad de la enzima no se ha podido correlacionar significativamente tomando como referencia las ratas del experimento 1.

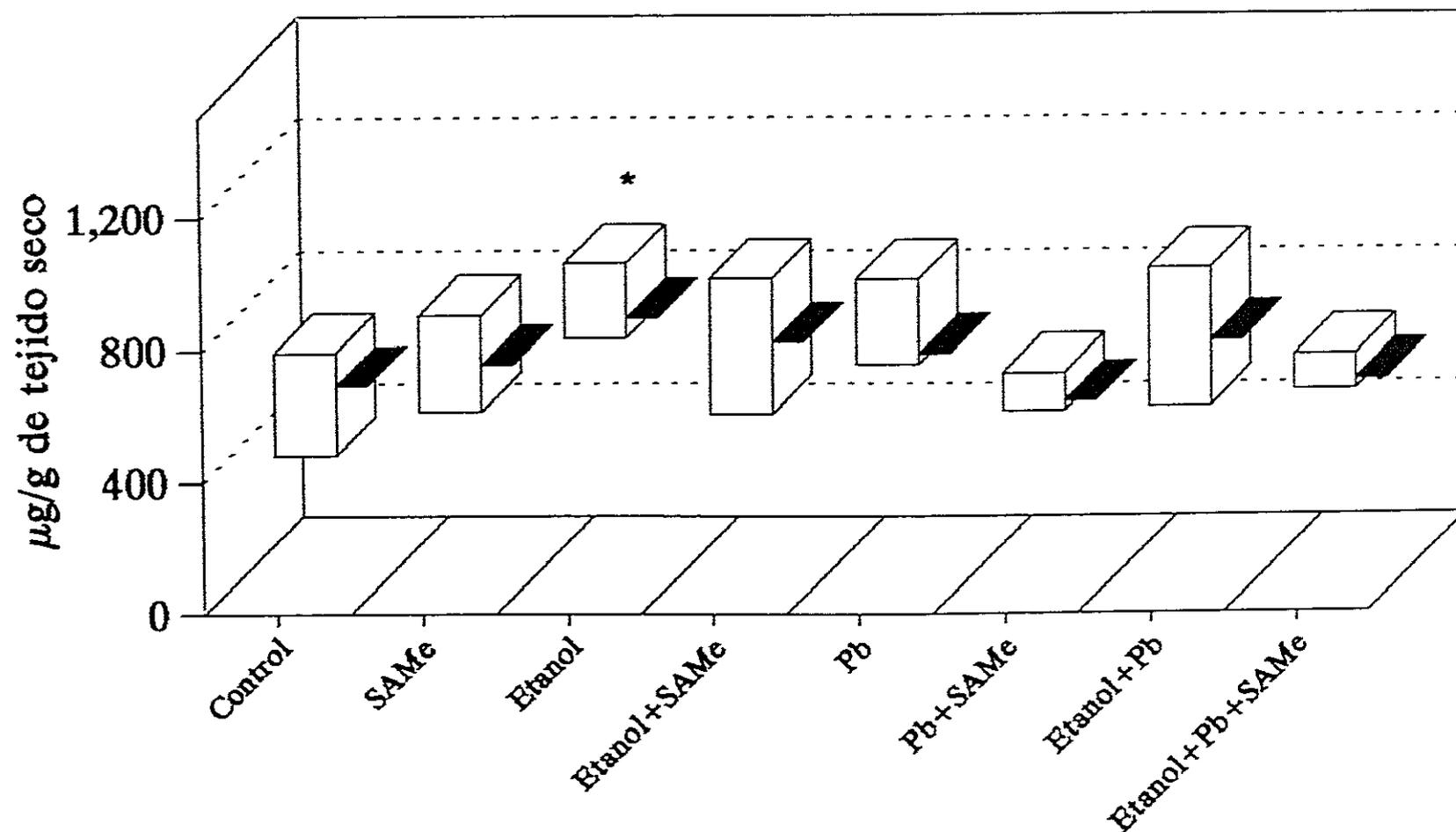
La deficiencia de zinc en el grupo de intoxicación conjunta podría ser explicado parcialmente por el hecho de que en los alcohólicos crónicos se ha descrito una mala absorción de zinc, objetivándose una menor concentración plasmática del metal en dichos pacientes respecto de un colectivo de sujetos controles sanos y respecto a otro colectivo de hepatópatas no alcohólicos (Killerich y cols. 1980; Valberg y cols. 1985).

Figura 27.- Contenido hepático de Zinc



*: p < 0.05 vs Control

Figura 28.- Contenido hepático de Hierro



*: $p < 0.05$ vs Control

Kulikowska y cols. (1989) describieron cómo un tratamiento con alcohol en ratas con intoxicación crónica por plomo disminuía el efecto protector que la administración de zinc ejercía sobre la actividad de la ALA-D. Sin embargo, este efecto terapéutico del zinc en la intoxicación por plomo ha sido cuestionado recientemente al proponer que altas concentraciones de zinc mostrarán un efecto inhibitorio (Muñoz y cols. 1994).

Es interesante reseñar que la habitual terapia con quelantes para el tratamiento del saturnismo podría tener un efecto adverso en pacientes alcohólicos con impregnación por plomo en los que la tasa hepática de zinc se encontrase disminuida, ya que se ha publicado que un prolongado tratamiento quelante con EDTA provoca una pérdida de zinc por orina 17 veces superior a la normal (Ishinara y cols. 1984), lo que podría afectar a la actividad de diversas enzimas dependientes de zinc como la ALA-D. Además, el zinc juega un importante papel en el mantenimiento de las Zn-tionefinas que a su vez, intervienen en procesos de defensa celular frente a la hepatotoxicidad de ciertos xenobióticos (Parsons y cols. 1992). En este sentido, el SAME podría mostrarse como una terapia útil, pues permite una mejor utilización del zinc hepático y normaliza a su vez el metabolismo del hígado, al participar en un gran número de reacciones enzimáticas.

El mayor contenido de hierro hepático medido en las ratas alcohólicas de nuestra experiencia (Figura 28) respecto del grupo control, tiene su reflejo en la bibliografía médica sobre el alcoholismo (Friedman y cols. 1966) en la que se describe una mayor absorción de hierro en pacientes etílicos crónicos ("siderosis alcohólica"). En el grupo de intoxicación conjunta se constató un aumento de la concentración férrica hepática que no llegó a alcanzar significación estadística. Es destacable indicar que se ha descrito un efecto sinérgico en la hepatotoxicidad del alcohol y del hierro en estados de sobrecarga de este metal en referencia a fenómenos como la peroxidación lipídica o la fibrosis, lo que agravaría la disfunción hepática del alcohólico siderótico (Hann y cols. 1992).

No hemos constatado ninguna modificación significativa en la concentración de cobre en hígado tras las diferentes intoxicaciones estudiadas. De hecho, en pacientes alcohólicos sólo ha podido objetivarse deficiencia de cobre en estados de grandes carencias nutricionales (Schüller 1991), extremo que se ha evitado en el modelo experimental por la utilización de dietas semilíquidas de Lieber-DeCarli. Aunque en la intoxicación por plomo se han descrito carencias de cobre, tales efectos han tenido lugar en situaciones en las que el saturnismo ha desembocado en anemia, con la consiguiente alteración del metabolismo del hierro (Miniuk y cols. 1989).

Concentración de porfirinas en sangre y tejidos

La elevada protoporfirinemia descrita en la intoxicación por plomo queda corroborada en nuestro trabajo por los resultados expuestos en la Figura 29. Según algunos autores este aumento de la protoporfirina eritrocitaria se debe a una inhibición del último paso de la ruta biosintética del hemo, en concreto de la enzima ferroquelatasa (Campbell y cols. 1977); más recientemente, Rossi y cols. (1990) mantienen la teoría de que un desacoplado metabolismo del hierro impediría la unión de este metal al núcleo porfirínico, con el consiguiente aumento de la tasa de ZPP.

Aunque no existe sinergia entre la acción tóxica del plomo y del etanol en la concentración de PPE, se observa que también el alcohol ocasiona por sí sólo un discreto aumento no significativo de la tasa de PPE. Se ha descrito en el alcoholismo una acusada depresión de la enzima ferroquelatasa, fenómeno éste que puede ser de particular importancia en la etiología de la anemia sideroblástica relacionada con el abuso etílico (Fraser y Schacter 1977; Li y cols. 1989).

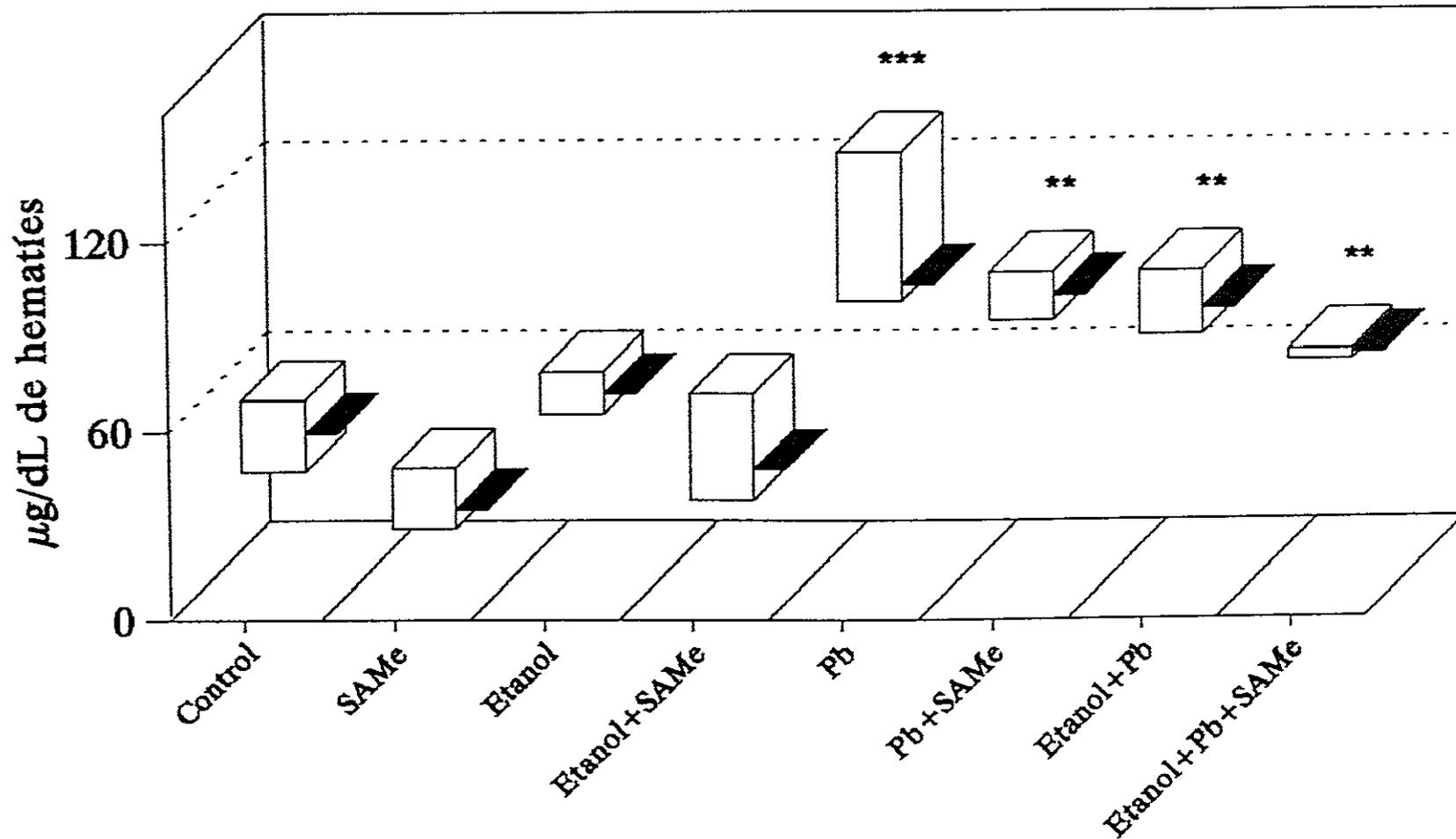
Si analizamos el cociente entre la protoporfirina eritrocitaria quelada o no con zinc (ZPP/PEL), observamos que el aumento de la PPE observada en el grupo de ratas alcohólicas se debe fundamentalmente a un aumento de la fracción libre de la

protoporfirina, consecuencia de la posible inhibición de la ferroquelatasa (Figura 30). La levedad de la intoxicación crónica por plomo inducida en los animales intoxicados por este metal, no logró inducir cambios en el cociente ZPP/PEL; tal efecto no se corresponde al descrito en la intoxicación aguda (Schwartz y cols. 1980), por lo que el efecto del plomo sobre la última etapa de la porfirinosíntesis pudiera tener en una primera etapa una acción directa sobre la actividad de la enzima y un posterior efecto sobre el estado de oxidación del hierro, dependiendo siempre de la intensidad de la exposición al metal tóxico.

Respecto a la concentración de porfirinas tisulares, solamente la tasa de URO hepática mostró diferencias significativas respecto de las halladas en el grupo control (Figuras 31 y 32). Este hecho pone de manifiesto la capacidad de compensación de ruta del hemo para mantener constante la concentración de sustratos enzimáticos. El aumento de la concentración de URO en hígado en los grupos tratados con plomo y con alcohol + plomo podría explicarse por la posible inhibición que el plomo y otros metales pesados ejercen sobre la actividad de la enzima sulfidrilica URO-D, así como la acción tóxica directa del etanol sobre su actividad (Doss y cols. 1981). Resultados comparables obtuvieron Christenson y cols. (1985), que encontraron en ratas expuestas al plomo, una mayor concentración de URO en otro órgano masivamente productor de porfirinas como es la médula ósea, aunque no observaron acumulación en la tasa de URO hepática o renal.

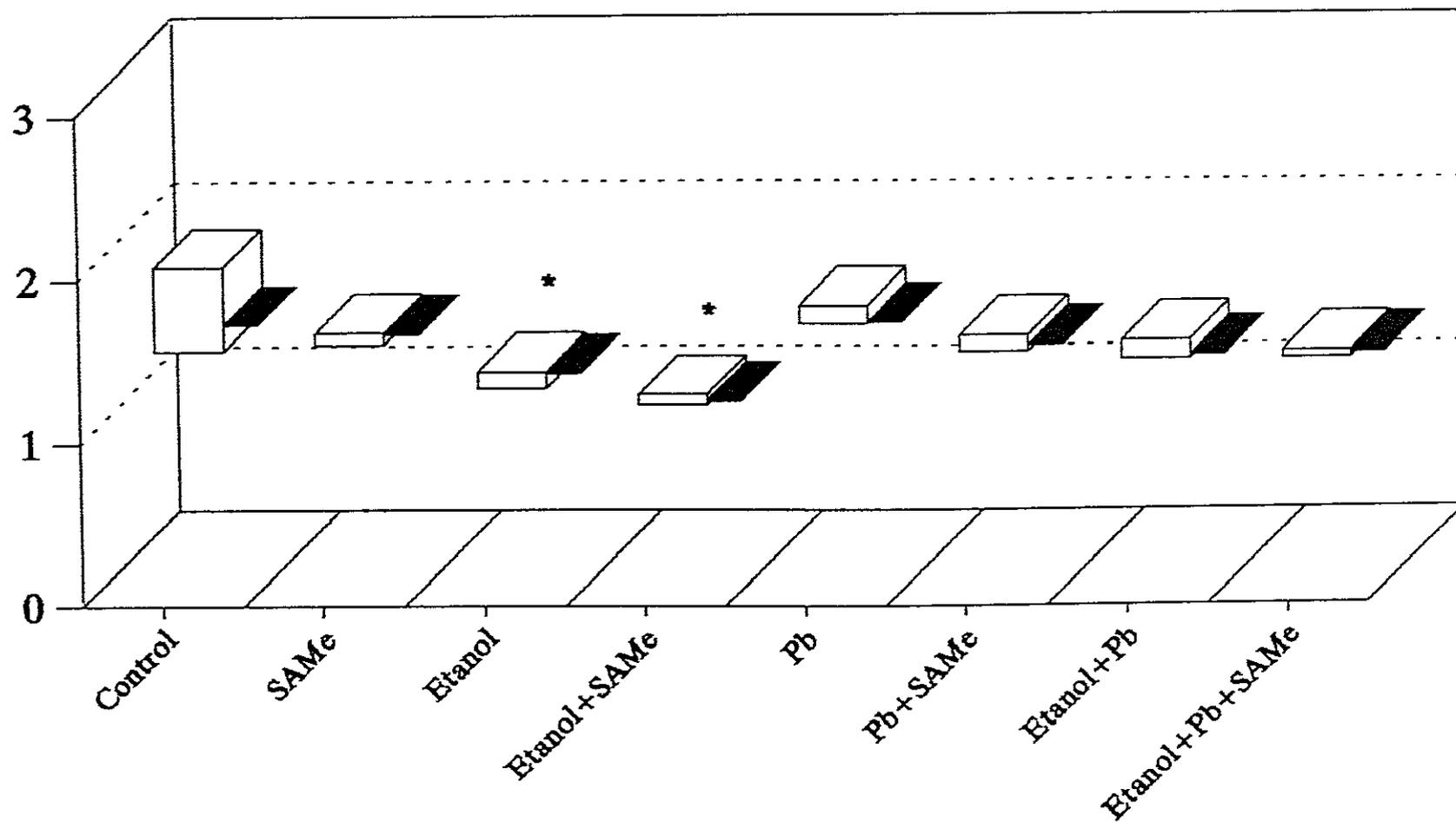
El tratamiento con SAME normalizó los niveles de URO hepático, probablemente por un efecto protector de los grupos tiólicos del SAME sobre los grupos -SH del centro activo de la URO-D. Cantoni y cols. (1990), al estudiar el efecto de otro potente inhibidor de la URO-D, el hexaclorobenceno, observó como una terapia con SAME provocaba una reducción en la acumulación de porfirinas.

Figura 29.- Tasa de Protoporfirina eritrocitaria



** , ***: p<0.01, p<0.001 vs Control

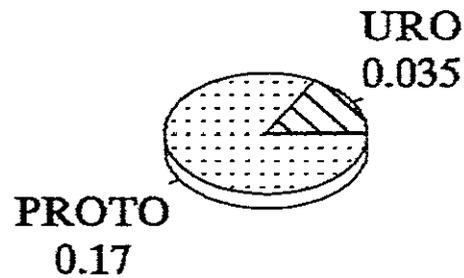
Figura 30.- Cociente ZPP/PEL



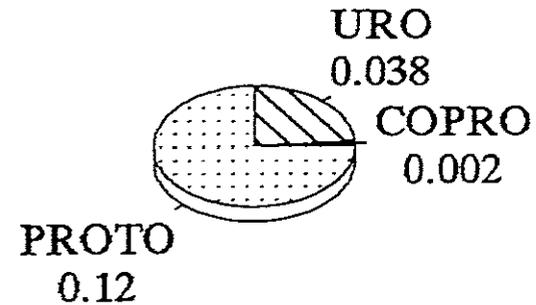
*: $p < 0.05$ vs Control

Figura 31.- Porfirinas en hígado

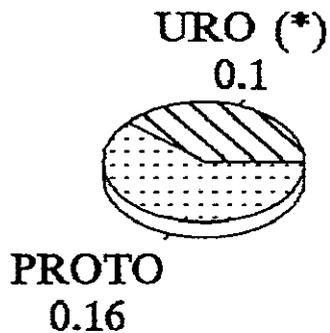
Grupos Control, Etanol, Pb y Etanol+Pb



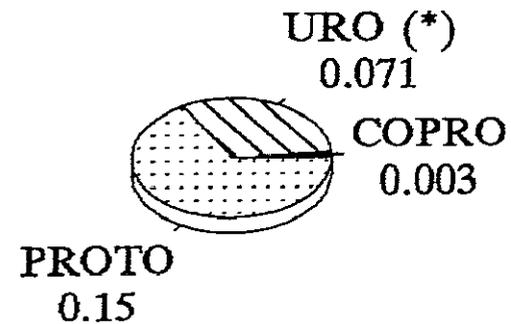
CONTROL



ALCOHOL



PLOMO

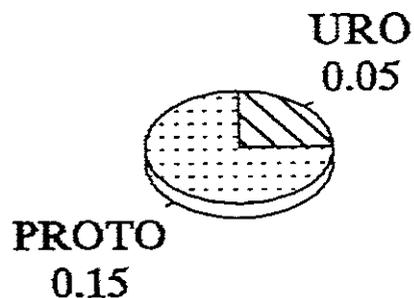


ALCOHOL+PLOMO

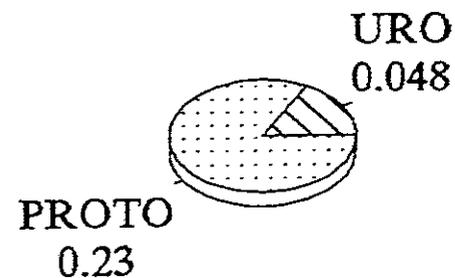
$\mu\text{g/g}$ de tejido fresco. (*) $p < 0.05$ vs Control

Figura 32.- Porfirinas en hígado

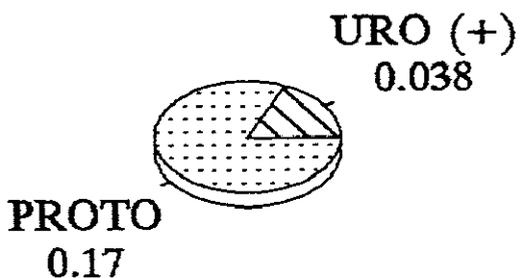
Grupos SAME, Etanol+SAME, Pb+SAME y Etanol+Pb+SAME



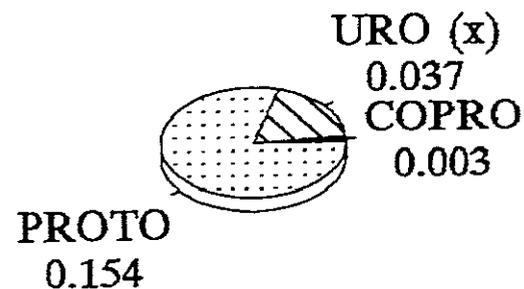
SAMe



ALCOHOL+SAMe



PLOMO+SAMe



ALCOHOL+PLOMO+SAMe

μg/g de tejido fresco.

(+) $p < 0.05$ vs Plomo. (x) $p < 0.05$ vs Alcohol+Plomo

Excreción de porfirinas y precursores

La excreción urinaria de porfirinas en el alcoholismo, cuya alteración es objeto de debate (Orten y cols. 1963; Li y cols. 1989) no mostró en nuestro estudio variaciones relevantes aunque mostró un patrón muy irregular en el periodo de seguimiento (Figura 33). Esta relativa uniformidad unida a la no modificación de la tasa de COPRO hepática o renal, indica la probable indemnidad de la enzima COPRO-OX tanto en la intoxicación alcohólica como en la saturnina.

Nuestro grupo de trabajo demostró que la excreción elevada de COPRO en las hepatopatías crónicas depende más del grado de colestasis que de la severidad de la lesión hepática o del grado de ingesta etílica (Guerra y cols. 1985), debido a una derivación de la eliminación de la COPRO desde la vía biliar hacia la renal.

La medición de los precursores ALA y PBG en orina durante un seguimiento de 60 días mostró igualmente un perfil muy irregular que no permitió comprobar la hipótesis de la elevación en su excreción tras la exposición al plomo (Figura 34). Parece clara, sin embargo, la poca utilidad y falta de sensibilidad de marcadores de intoxicación plúmbica (COPRO o ALA) en orina, parámetros hasta hace poco utilizados en análisis discriminatorios de exposición al metal tóxico. Además, los trabajos de Tomokuni e Ichiba (1990) demuestran que la cronicidad de la exposición al plomo atenúa la excreción de ALA en orina.

Es reseñable la reciente aportación de Bowers y cols. (1992) en la que estudian la variabilidad en la excreción de porfirinas en ratas de diferentes cepas. Estos autores encuentran en las ratas Sprague-Dawley una variación interanimal desde 0.9 a 59.6 nmol/24h (64 veces). Adicionalmente, una misma rata podía variar su porfirinuria del orden de 5 veces en un periodo de 4 semanas. Este estudio cuestiona la utilidad de la utilización de modelos experimentales en el seguimiento seriado del patrón de excreción de porfirinas en ratas.

Figura 33.- Excreción urinaria de porfirinas

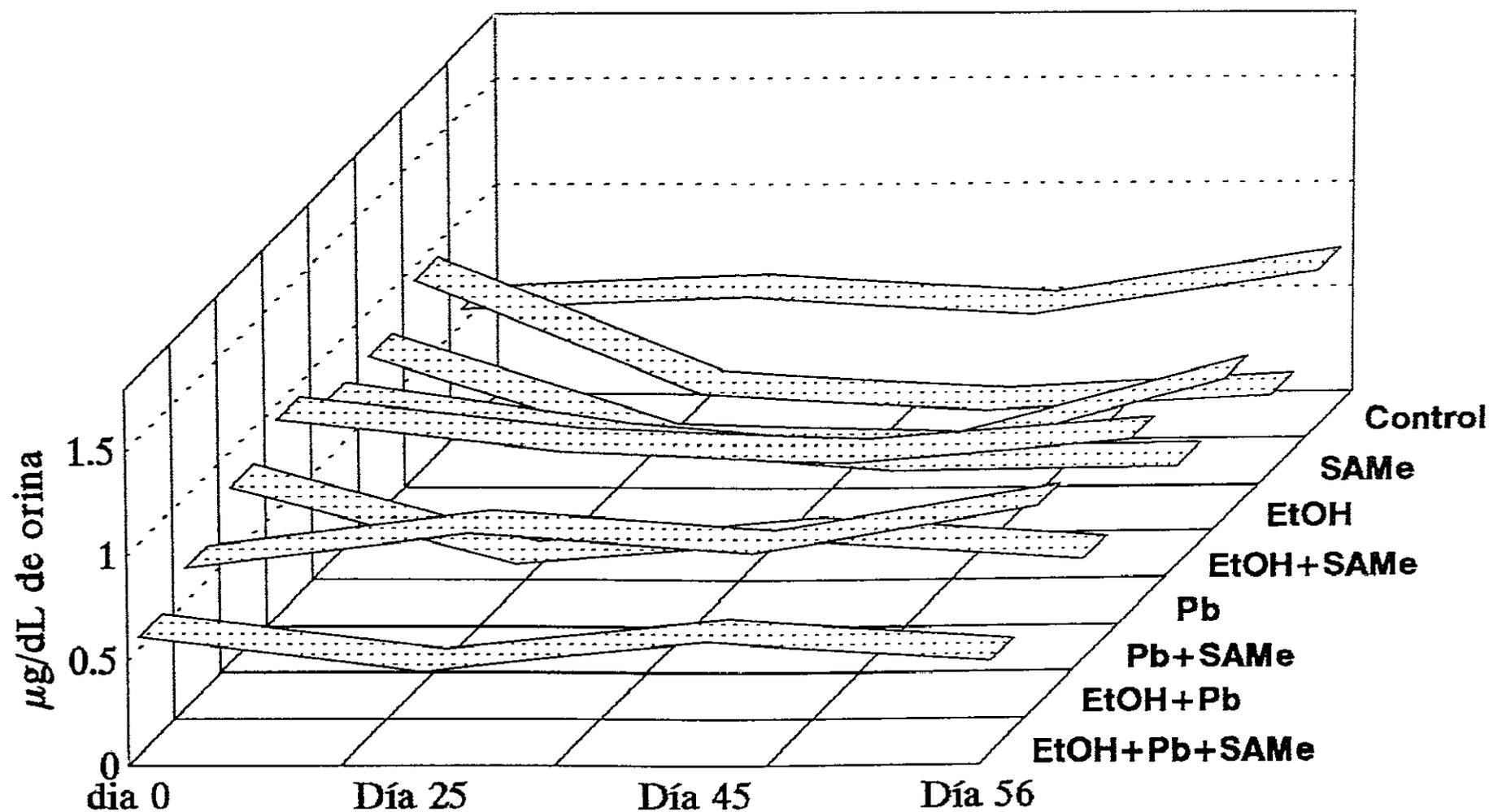
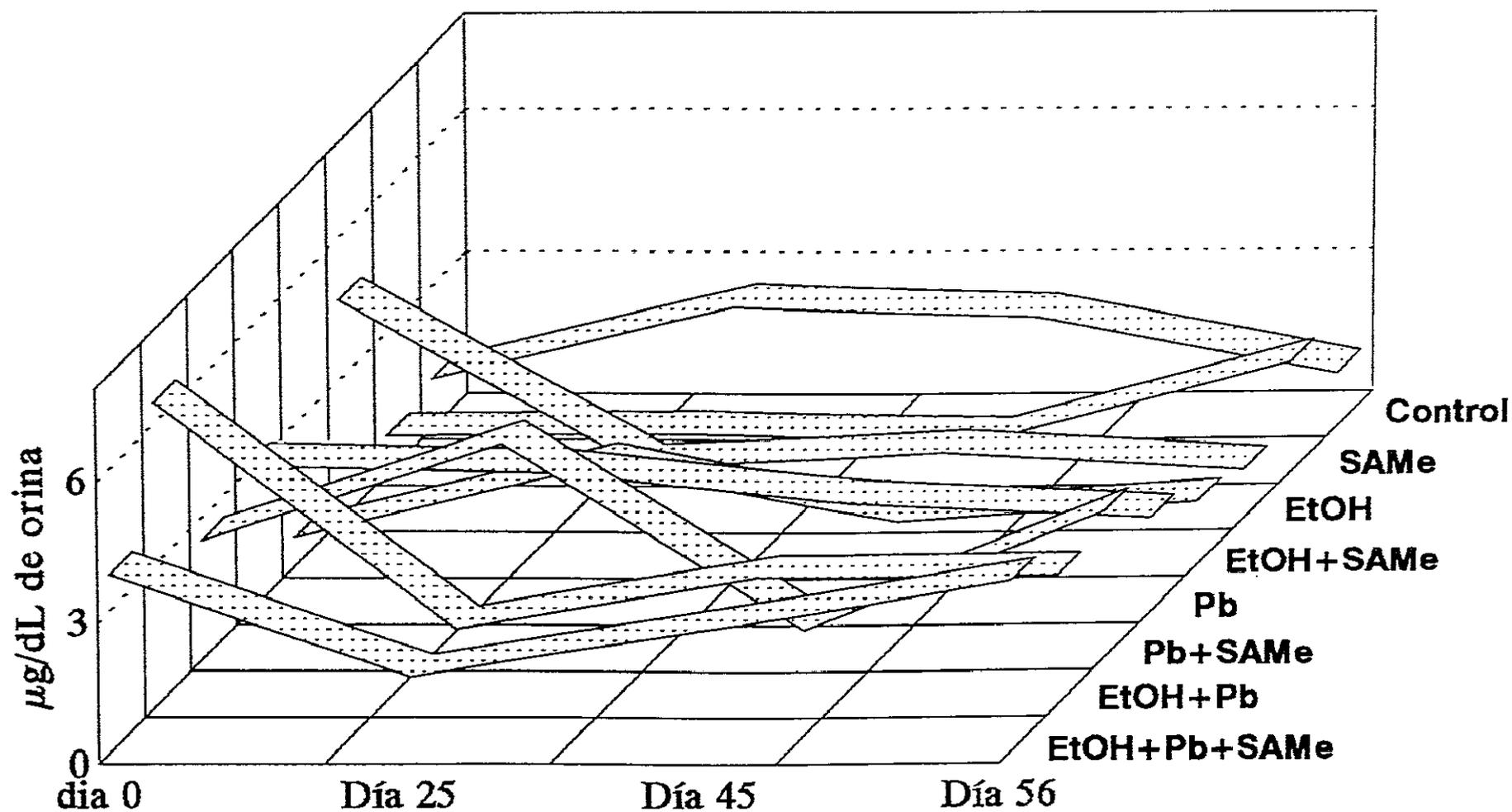


Figura 34.- Excreción urinaria de ALA



Características generales

El cociente peso hígado/peso rata no se modificó en ninguno de los grupos de estudio lo que indica que, en el caso de la intoxicación etílica, no se objetivaron los cambios macroscópicos frecuentemente observados en la estructura del hígado en procesos de esteatosis alcohólica.

El peso de los animales de experimentación no varió en función del grupo asignado. La elección de un modelo experimental de intoxicación alcohólica basado en la utilización de dietas semilíquidas eliminó las carencias nutricionales a las que tradicionalmente se asociaba el daño hepático.

RECAPITULACION Y CONCLUSIONES

RECAPITULACION

Se consiguió inducir una evidente aunque leve intoxicación por plomo en los animales de experimentación, que no llegó a desembocar en anemia. Por otro lado, las deficiencias nutricionales asociadas al etilismo crónico se minimizaron en nuestro modelo experimental gracias a la utilización de dietas alcohólicas semilíquidas.

El plomo indujo una clara inhibición sobre la enzima ALA-D eritrocitaria y un aumento de su síntesis, así como una discreta inhibición de la enzima hepática con un aumento compensador de la enzima ALA-S en dicho órgano. La levedad de la exposición al metal tóxico no permitió objetivar cambios en la actividad de la PBG-D, segunda enzima limitante de la ruta. Por otro lado, la ingesta crónica de etanol sólo marcó tendencias en la inhibición de la ALA-D sanguínea y hepática, sin inducir cambios compensatorios en la actividad de las enzimas limitantes de la ruta biosintética del hemo. La intoxicación conjunta por ambos tóxicos no mostró ningún efecto inhibitorio sinérgico sobre la actividad de las enzimas ALA-D, ALA-S o PBG-D.

El metabolismo renal de la síntesis del hemo, apenas ha sufrido modificaciones en este estudio, probablemente debido a la especificidad de ambos tóxicos por el hígado como órgano diana.

El alto contenido de URO en hígado constatado en los grupos de ratas expuestos al plomo, muestra el posible efecto que este metal pesado ejerce sobre la actividad de la URO-D, mientras que la no modificación de la excreción urinaria de COPRO en las intoxicaciones por plomo y/o etanol señalan la posible indemnidad de la enzima COPRO-OX frente a la acción tóxica de ambos xenobióticos.

Se objetivó un aumento de la tasa de protoporfirina eritrocitaria en la intoxicación plúmbica, confirmando la utilidad de este parámetro en la detección del saturnismo.

Los marcadores urinarios de saturnismo (ALA y COPRO) o de alcoholismo (COPRO) no se modificaron significativamente en nuestro modelo de intoxicación crónica.

La intoxicación conjunta por plomo y etanol indujo una disminución de los niveles hepáticos de zinc. Tal déficit no se objetivó al administrarse los dos tóxicos separadamente. En el grupo que recibió etanol, se indujo una leve hepatosiderosis.

El contenido hepático de GSH mostró sólo en el grupo alcohólico una tendencia a su descenso que no alcanzó significación estadística.

El tratamiento con SAME redujo la incrementada tasa de URO hepática objetivada tras la administración de plomo y normalizó igualmente la concentración de zinc hepático tras la intoxicación conjunta. Sin embargo, aunque corrigió la hiperactividad de la ALA-S, no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo sobre la actividad de las enzimas ALA-D o PBG-D o sobre la acumulación de plomo en sangre o tejidos.

CONCLUSIONES

1.- Tras analizar los efectos de las intoxicaciones crónicas experimentales por alcohol y por plomo sobre la biosíntesis del hemo, no se pudo comprobar la existencia de una acción sinérgica de ambos tóxicos sobre esta ruta metabólica.

2.- Aunque en experimentos previos no incluidos en esta tesis habíamos observado que la terapia con S-Adenosil-L-Metionina se mostraba útil en el tratamiento del saturnismo experimental, en el presente trabajo únicamente hemos podido constatar que este fármaco tendió a atenuar las alteraciones de la porfirinosíntesis inducidas por el plomo.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abbondanza A, Batelli MG, Soffritti M, Cessi C. Xanthine oxidase status in ethanol-intoxicated rat liver. *Alcohol.Chn.Exp.Res.* 1989; 13: 841-844.
- Abdulla M, Svonsson S. Effect of oral Zn intake on delta-aminolevulinic acid dehydratase in red blood cells. *Scand.J.Chn.Lab.Med.* 1979; 39: 31-36.
- Abraham NG, Nelson JC, Ahmed T, Konwalinka G, Lovero RD. Erythropoietin controls heme metabolic enzymes in normal human bone marrow culture. *Exp.Hematol.* 1989; 17: 908-913.
- Adjarov D, Naydenova R, Korimova M, Pentieva K. Influence of protein-calorie malnutrition on the activity of δ -aminolevulinic acid dehydratase in rat liver and erythrocytes. *Nether.J.Med.* 1993; 42: A50.
- Alperstein G, Reznick RB, Duggin GG. Lead: subtle forms and new modes of poisoning. *Med.J.Australia.* 1991; 155: 407-409.
- Alvarez AP, Kappas A. Lead and polychlorinated biphenils: effects on heme and drug metabolism. *Drug.Metab.Rev.* 1979; 10: 91-106.
- Alvarez AP, Fischbein A, Sassa S, Anderson KK, Kappas A. Lead intoxication: effects on cytochrome P-450-mediated hepatic oxidations. *Clin.Pharm.Thor.* 1975; 19: 183-190.
- Anderson PM, Dennick RJ. Porphobilinogen deaminase: methods and principles of the enzymatic assay. *Kuzyrn.* 1982; 28: 146-157.
- Aposhian HV, Aposhian MM. Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid: chemical, pharmacological and toxicological properties of an orally effective metal chelating agent. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 1990; 30: 279-306.
- Arroyo M, Molina MA, Martín-Serrano, Pérez-Cuadrado S. Determinación analítica de diferentes metales en células hepáticas fetales hofilizadas. *Med.Seguridad.Trabajo.* 1988; 35: 30-36.
- Arroyo M, Molina MA, Martín-Serrano J, Pérez-Cuadrado S. Determinación analítica conjunta de plomo y cadmio en viales de resistocell. *Med.Seguridad.Trabajo.* 1989; 36: 49-64.
- Astrin KH, Warner CA, Yoo HW, Goodfellow PJ, Tsai SF, Dennick RJ. Regional assignment of the human uroporphyrinogen III synthase (UROS) gene to chromosome 10q25.2-q26.3. *Hum.Genet.* 1991; 87: 18-22.
- Axelsson K, Eriksson S, Mannervik B. Purification and characterization of cytoplasmic thioltransferase (glutathione: disulfide oxidoreductase) from rat liver. *Biochemistry.* 1978; 17: 2978-2984.
- Backlund PS, Chang CP, Smith RA. Identification of 2-keto-methylthiobutyrate as an intermediate compound in methionine synthesis from 5'-methylthioadenosine. *J.Biol.Chem.* 1982; 257: 4196-4202.
- Badawy AAB, Morgan CJ, Davis NR. Tryptophan pyrrolase and the regulation of mammalian hepatic haem biosynthesis. In: Porphyrins and Porphyrins. Nordmann Y. (ed). INSERM/John Libbey. Paris 1986. pp:69-81.
- Baghurst PA, McMichael AJ, Wigg NR, Vimpani GV, Robertson RF, Roberts RJ, Tong SL. Environmental exposure to lead and children's intelligence at the age of seven years. *N.Engl.J.Med.* 1992; 327: 1279-1284.
- Darak AJ, Beckenhauer HC, Tuma DJ. Ethanol feeding inhibits the activity of hepatic N⁵-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase in the rat. *IRCS.Med.Sci.* 1985; 13: 760-761.

- Baranyai JM, Blum JJ. Quantitative analysis of intermediary metabolism in rat hepatocytes incubated in the presence and absence of ethanol with a substrate mixture including ketoleucine. *Biochem.J.* 1989; 258: 121-140.
- Battle AMC, Benson A, Rimington C. Purification and properties of coproporphyrinogenase. *Biochem.J.* 1965; 97: 731-740.
- Battle AMC. Tetrapyrrole Biosynthesis. *Semin.Dermatol.* 1986; 5: 70-87.
- Battle AMC, Paraden SR, Fukuda H, Kozicki PA, Rossotti MV. S-adenosyl-L-methionine, a mechanism for its action on lead mobilization and disposal in lead poisoning. *Biochem.Arch.* 1986; 2: 293-303.
- Battle AMC, Stella AM, DeKaminsky AR, Kaminsky C, Mariano HG. Two cases of infantile porphyria cutanea tarda: successful treatment with oral S-adenosyl-L-methionine and low-dose oral chloroquine. *Br.J.Dermatol.* 1987; 116: 407-415.
- Battersby AR, McDonald R. Biosynthesis of porphyrins, chlorins and corrins. In: *Porphyrins and metalloporphyrins.* Smith KM (ed). Elsevier. Amsterdam 1975. pp: 61-122.
- Battistuzzi G, Patrucci R, Silvagni I, Urbani FR, Calola S. δ -aminolevulinic acid dehydratase: a new genetic polymorphism in man. *Ann.Hum.Genet.* 1981; 45: 223-229.
- Batuman V, Landy R, Maenaka J, Wodeon R. Contribution of lead to hypertension with renal impairment. *N.Engl.J.Med.* 1983; 309: 17-21.
- Bellinger D, Leviton A, Wateraux C, Noodloman H, Rabinowitz M. Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *N.Engl.J.Med.* 1987; 316: 1037-1043.
- Bellomo G, Orrenius S. Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. *Hepatology.* 1985; 5: 876-882.
- Berlin A, Schaller KH. European standardized method for the determination of δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 1974; 12: 389-390.
- Boru N, Goldwasser R. The regulation of heme biosynthesis during erythropoietin-induced erythroid differentiation. *J.Biol.Chem.* 1985; 260: 9251-9257.
- Bokern DR. Porphyria: Basic science aspect. *Dermatol.Clin.* 1986; 4: 277-290.
- Blann KG, Thibert RJ, Lam LK. A study of the mechanism of Jaffé reaction. *J.Clin.Chem.Biochem.* 1974; 12: 336-343.
- Bloomer JR, Straka JG. Porphyrin metabolism. In: *The liver: Biology and Pathobiology.* Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz A (ed). Raven Press. New York 1988. pp: 451-466.
- Bogard M, Camadro JM, Nordmann Y, Labbe P. Purification and properties of mouse liver coproporphyrinogen oxidase. *Eur.J.Biochem.* 1989; 181: 417-421.
- Bonkovsky HL, Healy NF, Sinclair PR, Sinclair JP, Shedlofsky SI, Elder GH. Iron and the liver: acute effects of iron-loaded on hepatic heme synthesis of rats. *J.Clin.Invest.* 1983; 71: 1175-1182.
- Bonkovsky HL, Healey JP, Sinclair PR, Mayer YP, Erny R. Metabolism of hepatic haem and "green pigments" in rats given 2-allyl-2-isopropylacetamide and ferric citrate. *Biochem.J.* 1980; 188: 289-295.
- Borthwick IA, Srivastava G, Day AR, Pirola BA, Snoswell MA, May BK, Elliot WH. Complete nucleotide sequence of hepatic δ -aminolevulinic acid synthase. *Eur.J.Biochem.* 1985; 150: 481-484.

- Bortoli A, Fazzini G, Marin V. Relationships between blood lead concentration and aminolevulinic acid dehydratase in alcoholic and workers industrially exposed to lead. *Arch. Environ. Health.* 1986; 41: 251-260.
- Bosron WF, Li TK. Catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase-isoenzymes. *Enzyme.* 1987; 37:19-28.
- Bottomley SS, Muller-Rberhard U. Pathophysiology of heme synthesis. *Semin. Hematol.* 1988; 25: 282-302.
- Bowers MA, Luckhurst CL, Davis HA, Woods JS. Investigation of factors influencing urinary porphyrin excretion in rats: strain, gender and age. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1992; 19: 538-544.
- Bray GP, Trodger JM, Williams R. S-adenosylmethionine protects against acetaminophen hepatotoxicity in two mouse models. *Hepatology.* 1992; 15: 297-301.
- Bronnan RJW, Cantrell RC. δ -Aminolevulinic acid is a potent agonist for GABA receptors. *Nature.* 1979; 280: 514-515.
- Brodie MJ, Moore MR, Thompson GG, Campbell BC, Goldberg A. Is porphobilinogen deaminase activity a secondary control mechanism in haem biosynthesis in humans?. *Biochem. Soc. Trans.* 1977; 5: 1466-1468.
- Brunt P. The liver and the alcohol. *J. Hepatol.* 1988; 7: 377-383.
- Burguera JI, Burguera, Rondón CB, Rivas C, Burguera JA, Alarcón OM. Determination of lead in hair of exposed gas station workers and in unexposed adults by microwave-aided dissolution of samples and flow injection/atomic absorption spectrometry. *J. Trace Elem. Electrolytes. Health. Dis.* 1987; 1: 21-26.
- Burton G, Fagerberg PR, Hosozawa S, Jordan PM, Scott AI. ¹³C N.M.R. Evidence for a new intermediate, preuroporphyrinogen, in the enzymic transformation of porphobilinogen into uroporphyrinogens I and III. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1979; 202-204.
- Cabrero C, Puerta J, Alomany S. Purification and comparison of two forms of S-Adenosyl-L-Methionine synthetase from rat liver. *Eur. J. Biochem.* 1987; 170: 299-304.
- Campbell BC, Brodie MJ, Thompson GG, Meredith PA, Moore MR, Goldberg A. Alterations in the activity of enzymes of haem biosynthesis in lead poisoning and acute hepatic porphyria. *Clin. Sci. Mol. Med.* 1977; 53: 335-340.
- Canepa RT, Llambías RBC, y Grinstein M. Effect of glucose on induction of δ -aminolevulinic acid synthase, ferrochelatase and cytochrome P-450 hemoproteins in isolated rat hepatocytes by phenobarbital and lead. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985; 841: 186-194.
- Cantoni L, Budillon G, Cuomo R, Rodino S, Le Grazie C, Di Padova C, Rizzardini M. Protective effect of S-adenosyl-L-methionine in hepatic uroporphyrin. Evaluation in an experimental model. *Scand. J. Gastroenterol.* 1990; 25: 1034-1040.
- Cartón JA. Saturnismo: epidemiología y diagnóstico. *Med. Clin.* 1985; 84: 492-499.
- Colton T. Estadística en medicina. Masson-Salvat. Barcelona 1991. pp: 227-236.
- Corongiu FP, Milla A. Rise of hepatic glutathione concentration induced in rats by chronic lead nitrate treatment. Its role in Aflatoxin B₁ intoxication. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1982; 38: 97-112.
- Corrales F, Cabrero C, Pajares MA, Ortiz P, Martín-Duce A, Mato JM. Inactivation and dissociation of S-Adenosylmethionine synthetase by modification of sulfhydryl groups and its possible occurrence in cirrhosis. *Hepatology.* 1990; 11: 216-222.
- Cory-Slechta D, Walsh B, Cox CH. Mobilization and redistribution of lead over the course of calcium disodium ethylenediamine tetraacetate chelation therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987;

243: 804-813.

Cox TC, Hawden MJ, Abraham NG, Bottomley SS, May BK, Baker R, Chen LZ, Sutherland GR. Erythroid 5-aminolevulinic synthase is located on the X-chromosome. *Amer.J.Hum.Genet.* 1990; 46: 107-111.

Cronholm T. Incorporation of the 1-pro-R and 1-pro-S hydrogen atoms of ethanol in the reduction of acids in the liver intact rats and in isolated hepatocytes. *Biochem.J.* 1985; 229: 323-331.

Charney R, Kessler B, Partel M, Jackson D. Childhood lead poisoning. A controlled trial of the effect of dust control measures on blood lead levels. *N.Engl.J.Med.* 1983; 309: 1089-1093.

Chawla RK, Honkovsky HL, Galambos JT. Biochemistry and pharmacology of s-adenosyl-L-methionine and rationale for its use in liver disease. *Drugs.* 1990; 40 supplemento 3: 98-110.

Chretien S, Dubart A, Beaupain D, Ralch N, Grandchamp B, Rosa J, Goosens M, Romeo PH. Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1988; 85: 6-10.

Christenson WR, Vijayapal RR, Piper WN. Uroporphyrin accumulation in the bone marrow of rats exposed to lead. *Biochem.Pharmacol.* 1985; 34: 4345-4347.

Dally HA. Effect of sulfhydryl modification on the activity of bovine ferrochelatase. *J.Biol.Chem.* 1984; 259: 2711-2715.

Davis JR, Avram MJ. A comparison of the stimulating effects of cadmium and zinc on normal and lead-inhibited human erythrocytic delta aminolevulinic acid dehydratase activity in vitro. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 1978; 44: 181-190.

De Vernouil H, Saana S, Kappas A. Purification and properties of uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes. A single enzyme catalyzing the four sequential decarboxylation of uroporphyrinogens I and III. *J.Biol.Chem.* 1983; 258: 2454-2460.

De Matteis F. Drugs and Porphyrin. *S.A.J.Lab.Chn.Med.* 1971; 17: 126-133.

De Rover CM, Rukmini C, Tulpule PG. Urinary porphyrin pattern in liver damage. *Food.Chem.Toxicol.* 1984; 23: 241-243.

Deleve LD, Kaplowitz N. Importance and regulation of hepatic glutathione. *Sem.Liver.Dis.* 1990; 10: 251-266.

Dent AJ, Beyersmann D, Block C, Hasnain SS. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinic acid dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. *Biochemistry.* 1990; 29: 7822-7828.

Dhawan M, Flora SJS, Singh S, Tandon SK. Chelation of lead during co-exposure to ethanol. *Biochem.Intern.* 1989; 19: 1067-1075.

Dhawan M, Flora SJS, Tandon SK. Biochemical changes and essential metals concentration in lead-intoxicated rats pre-exposed to ethanol. *Alcohol.* 1992; 9: 241-245.

Dianzani MU. Lipid peroxidation in ethanol poisoning. A critical reconsideration. *Alcoholism.* 1985; 107: 526-545.

Dona M, Tlopermann R, Stutz G, Teschke R. Alcohol-induced decrease in uroporphyrinogen decarboxylase activity in rat liver and spleen. *Enzyme.* 1981; 26: 24-31.

Duce AM, Ortiz P, Cabrero C, Mato JM. S-Adenosyl-L-Methionine synthetase and phospholipid methyl transferase are inhibited in human cirrhosis. *Hepatology.* 1988; 8: 65-68.

- Dwarki VJ, Francis VNK, Bhat GJ, Padmanaban G. Regulation of cytochrome P-450 messenger RNA and apoprotein levels by heme. *J.Biol.Chem.* 1987; 262: 16958-16962.
- Eaton DL, Stacey NH, Lit Wong K, Klaasson CD. Dose-response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, haem oxygenase and cytochrome P-450. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 1980; 55: 393-402.
- Elder GH. Enzymatic defects in porphyria: an overview. *Semin.Liver.Dis.* 1982; 2: 87-99.
- Elder GH. The porphyria excretion pattern of symptomatic porphyria. *S.Afr.Med.J.* 1971; 17: 45-50.
- Elder GH, Evans JO. Evidence that the coproporphyrinogen oxidase activity of rat liver is situated in the intermembrane space of mitochondria. *Biochem.J.* 1978; 172: 345-347.
- Kiferink CJ, Sassa S, May BK. Regulation of 5-aminolevulinic synthase in mouse erythroleukemia cells is different from that in liver. *J.Biol.Chem.* 1988; 263: 13012-13016.
- Ruizquez de Salamanca R. Porfirias: errores congénitos del metabolismo. *An.Med.Intern.* 1985; 9: 412-415.
- Ruizquez de Salamanca R, Peña ML, Chinarro S, Olmos A, Mingo D, Miña C, Muñoz JJ. Quantitative and qualitative porphyrin excretion in normal subjects. *Int.J.Biochem.* 1982; 14: 251-254.
- Rehant CB. Lead study challenge. *Science.* 1992; 255: 783-784.
- Ruizquez de Salamanca R. Porfirinopatías y porfirias. Puesta al día. *Rev.Hep.Huf.Ap.Digestivo.* 1988; 73: 130-137.
- Feinman I, Lieber CS. Hepatic collagen metabolism. Effect of alcohol consumption in rat and in baboon. *Science.* 1972; 176: 795.
- Feo F, Pascale R, Garcea R, Dalno L, Pirlisi L, Frassetto S, Ruggiu ME, Di Padova C, Stramentinoli G. Effects of the variations of S-adenosyl-L-methionine liver content on fat accumulation and ethanol metabolism in ethanol-intoxicated rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 1986; 83: 331-341.
- Fernández-Checa JC. Regulación del glutatión hepático: alteración por el alcohol. *Gastroenterol.Hepatol.* 1989; 12: 48-54.
- Ferreira GC, Andrew TL, Karr SW, Dalley HA. Organization of the terminal two enzymes of the heme biosynthetic pathway. Orientation of protoporphyrinogen oxidase and evidence for a membrane complex. *J.Biol.Chem.* 1988; 263: 3835-3839.
- Finelli VN, Klauder DS, Karaffa MA. Interaction of zinc and lead on delta-aminolevulinic dehydratase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1975; 65: 303-311.
- Finkelstein JD. Regulación del metabolismo de la metionina en tejidos de mamíferos. En: *Papel de la S-Adenosil-L-Metionina en biología celular y patología.* Mato JM (ed). Jarpyo; Madrid 1990. pp: 9-23.
- Flegal AR, Smith DR. Lead levels in preindustrial humans. *N.Engl.J.Med.* 1992; 326:1293-1294.
- Flora SJS, Tandon SK. Effect of combined exposure to lead and ethanol on some biochemical indices in the rat. *Biochem.Pharmacol.* 1987; 36: 537-541.
- Fowler BA, Kimmel CA, Woods JS, McConnell RH, Grant LD. Chronic low-level lead toxicity in the rat. III. An integrated assessment of long-term toxicity with special reference to the kidney. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 1980; 56: 59-77.
- Fowler BA, Oskarsson A, Woods JS. Metal and metalloinduced porphyrinurias: relationships to cell injury. *Ann.New York.Acad.Sci.* 1987; 514: 172-182.

- Fraser MB, Schacter BA. Increased bone marrow delta aminolevulinic acid synthetase activity in the acute reversible sideroblastic anaemia of alcoholics. *Blood*. 1977; 50: 92.
- Freedman ML. Heme and iron metabolism in aging. *Blood.Cells*. 1987; 13: 227-235.
- Friedman BI, Schaefer JW, Schiff L. Increased iron-59 absorption in patients with hepatic cirrhosis. *J.Nucl.Med.* 1966; 7: 594
- Fulton M, Raab G, Thompson G, Hunter R, Laxon D, Hepburn W. Influence of blood lead on the ability and attainment of children in Edinburgh. *Lancet*. 1987; 1: 1221-1226.
- Galbraith RA, Drumont GS, Kappas A. Sn-Protoporphyrin supresses chemically induced experimental hepatic porphyria. Potential clinical implications. *J.Clin.Invest.* 1985; 76: 2436-2439.
- Gelman BB, Michaelson IA, Bus JS. The effect of lead on oxidative hemolysis and erythrocyte defense mechanism in the rat. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 1978; 45: 119-129.
- Geokas T, Klerman T, Leevy CM. Ethanol and cell replication in the digestive tracts. *Clin.Gastroenterol.* 1981; 2: 343-354.
- Gerson B. Lead. *Clin.Lab.Med.* 1990; 441-457.
- Gibbs PNB, Jordan PM. 5-Aminolevulinato dehydratase: zinc-65 binding and exchange with the enzyme from human erythrocytes. *Biochem.Soc.Trans.* 1981; 9: 232-233.
- Goering PL, Fowler BA. Kidney zinc-thionein regulation of 5-aminolevulinic acid dehydratase inhibition by lead. *Arch.Biochem.Biophys.* 1987a; 253: 48-55.
- Goering PL, Fowler BA. Metal constitution of metallothionein influences inhibition of 5-aminolevulinic acid dehydratase (porphobilinogen synthase) by lead. *Biochem.J.* 1987b; 245: 339-345.
- Goldman RH, Baker RL, Hannan M, Kamerow DB. Lead poisoning in automobile radiator mechanism. *N.Engl.J.Med.* 1987; 317: 214-218.
- González CR, Santolaria F, Torres-Ramírez A, Gallardo L. Concentración de plomo en el hueso y edad. *Med.Clin.* 1990; 94: 39.
- Gordon RR. Effect of an intoxicating dose of ethanol on lipid metabolism in an isolated, perfused rat liver. *Biochem.Pharmacol.* 1972; 21: 2991.
- Grandchamp B, Wall D, Nordmann Y, Van Cong N, De Verneuil H, Foubert C, Gross MS. Assignment of the gene for human coproporphyrinogen oxidase to chromosome 9. *Hum.Genet.* 1983; 64: 180-183.
- Grandchamp B, De Verneuil H, Beaumont C, Chretien S, Walter O, Nordmann Y. Tissue-specific expression of porphobilinogen deaminase: two isoenzymes from a single gene. *Eur.J.Biochem.* 1987; 162: 105-110.
- Grandchamp B, Nordmann Y. Enzymes of the heme biosynthesis pathway: Recent advances in molecular genetics. *Sem.Hematol.* 1988; 25: 303-311.
- Grandchamp B, Deybach JC, Greller M, Verneuil H, Nordmann Y. Studies of porphyrin synthesis in fibroblasts of patients with congenital erythropoietic porphyria and one patient with homozygous coproporphyrin. *Biochim.Biophys.Acta.* 1980; 629: 577-586.
- Granlok S. The induction in vitro of the synthesis of delta aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria: a response to certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals. *J.Biol.Chem.* 1966; 241: 1359-1375.
- Grillo A, López-Artigues 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.* 1990; 95: 281-285.

- Guerra P, Enriquez de Salamanca R, Toni P, Porpiña J, Ena J, Perezagua C. Estudio de la excreción urinaria de porfirinas en pacientes afectos de hepatopatía crónica. *Gastroenterol.Hepatol.* 1985; 8: 442-449.
- Guerra P. Alteraciones del metabolismo del hemo en pacientes con insuficiencia renal crónica en tratamiento con hemodiálisis. Universidad Complutense de Madrid. 1990. Tesis doctoral.
- Hann III, Yang S, Rubin R, Tran LP, Hann CL, Monduke H, Maddrey WC. Effect of iron on alcohol induced liver injury in rats. *Hepatology.* 1992; 16: 231A.
- Hart DL, Plomeli S. Simultaneous quantitation of zinc protoporphyrin and free protoporphyrin in erythrocytes by acetone extraction. *Clin.Chem.* 1981; 27: 220-222.
- Harvey P, Hamlin A, Kumar R, Dalves HT. Blood lead behaviour and intelligence test performance in preschool children. *Sci.Total.Environ.* 1984; 40: 45-60.
- Hernández JA, Lorente A, Pigrau C, Martínez JM. Saturnismo por aceitunas en vasija de barro vitrificadas en medio urbano. *An.Med.Intern.* 1987; 4:522-523.
- Hernberg S, Viokko R, Hasan J. Red cell membrane ATPases in workers exposed to inorganic lead. *Arch.EnvIron.Health.* 1967; 14: 319-324.
- Hernberg S, Nikkanen J. Enzyme inhibition by lead under normal urban conditions. *Lancet.* 1970; 1: 63-64.
- Hirano T, Kaplowitz N, Tsukamoto H, Kaminura S, Fernández-Checa JC. Hepatic mitochondrial glutathione and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology.* 1992; 16: 1423-1427.
- Hirata F, Axelrod J. Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science.* 1980; 209: 1082-1090.
- Hissin PJ, Hill R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analyt.Biochem.* 1976; 74: 214-226.
- Hjeller JJ, Poklis A, Fischer VW. The effect of inorganic lead on hepatic biochemical and ultrastructural changes produced by phenobarbital. *Toxicol.Lett.* 1982; 10: 101-108.
- Hoffbauer FW, Zaki FG. Choline deficiency in baboon and rat compared. *Arch.Pathol.* 1965; 79: 364-369.
- Holtzman D, Shen-Hau J. Early effects of inorganic lead on isolated rat brain mitochondrial respiration. *Pediatr.Res.* 1976; 10: 70-75.
- Horowitz JH, Rypins RB, Henderson JM, Hoysfield SB, Moffitt SD, Bain RP, Chawla RK, Bleier JC, Rudman D. Evidence of impairment of transsulfuration pathway in cirrhosis. *Gastroenterology.* 1981; 81: 668-675.
- Houston T, Fitzsimons RJ, Moore MR. The development of ALA synthase and ferrochelatase activity during normoblastic human erythropoiesis. *Nether.J.Med.* 1993; 42: A27.
- Hopf G, Böcker R, Bischoff J, Werner MG, Estler CJ. Investigation into the combined effects of ethanol and cadmium on rat liver and kidneys. *Arch.Toxicol.* 1990; 64: 470-473.
- Hueso J, Rico J, Hernández B, Pérez-Sandoval D, López-Arias C. Estudio de las porfirinas y ALA-dehidrasa en intoxicación crónica por plomo. *Rev.Diag.Biol.* 1989; 38: 7-10.
- Ishinara N, Shiojima S, Hasogawa K. Lead and zinc concentrations in plasma, erythrocytes, and urine in relation to ALA-D activity after intravenous infusion of Ca-EDTA. *Br.J.Ind.Med.* 1984; 41: 235-240.
- Jewell SA, Di Monte D, Gentile A, Guglielmi A, Altomare E, Albano O. Decreased hepatic glutathione in chronic alcoholic patients. *J.Hepatol.* 1986; 3: 1-6.

- Jordan PM, Berry A. Protoporphyrinogen: a universal intermediate in the biosynthesis of uroporphyrinogen III. *FRBS.Lett.* 1980; 112: 86-88.
- Jordan PM, Marshall L, Thomas S. The enzymes of uroporphyrinogen III biosynthesis. En: *Porphyrias and Porphyrins*. Nordmann Y. (ed). INSERM/ John Libbey. Paris 1986. pp 83-93.
- Kakimoto H, Kawata S, Imai Y, Inada M, Matsuzawa Y, Tarui S. Changes in lipid composition of erythrocyte membranes with administration of S-adenosyl-L-methionine in chronic liver disease. *Gastroenterol.Jpn.* 1992; 27: 508-513.
- Kappas A, Drummond GS. Control of heme and cytochrome P-450 metabolism by inorganic metals, organometals and synthetic metalloporphyrins. *Environ.Health.Perspect.* 1984; 54: 301-306.
- Kappas A, Sassa S, Galbraith R, Nordmann Y. The Porphyrias. En: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 6th Ed. Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, Stanbury J, Wyngaarden J, Fredrickson D (eds). McGraw-Hill. New York 1989; pp: 939-1007.
- Korshaw WC, Iga T, Klassen CD. Ethanol decreases cadmium hepatotoxicity in rats: possible role of hepatic metallothionein induction. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 1990; 106: 448-455.
- Kotteter H. Detoxification reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica.* 1986; 16: 957-973.
- Kawata M, Suzuki KT. Relation between metal and glutathione concentrations in mouse liver after cadmium, zinc or copper loading. *Toxicol.Lett.* 1983; 15: 131-137.
- Kikuchi G, Yoshida T. Function and induction of the microsomal heme oxygenase. *Mol.Cell.Biochem.* 1983; 53: 163-183.
- Killerich S, Dietrichson O, Loud PB, Stoff J, Christoffersen P, Juhl R, Klesm G, Christiansen C. Zinc depletion in alcoholic liver disease. *Scand.J.Gastroenterol.* 1980; 15: 363.
- Kondo M, Urata G, Shimizu Y. Decreased liver δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in porphyria cutanea tarda and in alcoholism. *Clin.Sci.* 1983; 65: 423-428.
- Krantz SB, Gallien-Lartigue O, Goldwasser R. The effect of erythropoietin upon heme synthesis by marrow cells in vitro. *J.Biol.Chem.* 1963; 238: 4085-4090.
- Kulikowska R, Mieluszko-Jankowiak J, Mieluski K. The effect of zinc on the toxic action of lead after administration of ethanol to rats. *Pol.J.pharmacol.Pharm.* 1989; 41: 281-289.
- Labbe RF, Carlson TH. The physiological role of zinc protoporphyrin: an hypothesis. *Nether.J.Med* 1993; 42: A22.
- Labbe RF, Nutter J, Cowger MI, Nielson LD. Control of haem synthesis effect of NAD on the induction of ALA synthetase. *Biochem.Mod.* 1970; 3: 465-474.
- Labbe RF. Lead poisoning mechanism. *Clin.Chem.* 1990; 36: 1870.
- Lane BP, Lieber CS. Ultrastructural alterations in human hepatocytes following ingestion of ethanol with adequate diets. *Am.J.Path.* 1966; 49: 595-603.
- Leeming TK, Donaldson WR. Effect of dietary methionine and lysine in the toxicity of ingested lead acetate in the chick. *J.Nutr.* 1984; 114: 2155-2159.
- Lenter MI, Horst RI, Thatcher RW. Protective effects of zinc and calcium against heavy metal impairment of children's cognitive function. *Nutr.Behav.* 1986; 3: 145-161.
- Li F, Lim CK, Simpson KJ, Peters TJ. Coproporphyrinogen oxidase, protoporphyrinogen oxidase and ferrochelatase activities in human liver biopsies with special reference to alcoholic liver disease. *J.Hepatol.* 1989; 8: 86-93.

- Lieber CS. Alcohol-induced hepatotoxicity. En: *Hepatotoxicology*. Meeks RG, Harrison SD, Hull RJ (ed). CRC Press. Boca Raton (Florida) 1991a. pp: 481-523.
- Lieber CS. Patogénesis y manejo de la hepatopatía alcohólica. En: *Papel de la S-Adenosil-L-metionina en biología celular y patología*. Mato JM (ed). JARPYO. Madrid 1990; pp:65-82.
- Lieber CS, Jones BP, DeCarli LM. Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite adequate diets. *J.Clin.Invest.* 1965; 44: 1009-1020.
- Lieber CS. Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *N.Engl.J.Med.* 1988a; 319: 1639-1650.
- Lieber CS. Alcohol and the liver: metabolism of ethanol, metabolic effects and pathogenesis of injury. *Act.Med.Scand.* 1985; 703: 11-55.
- Lieber CS, DeCarli LM, Sorrel MF. Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology* 1989; 10: 501-510.
- Lieber CS, Casini A, DeCarli LM, Kim C, Lowe N, Sasaki R, Leo MA. S-adenosyl-L-methionine attenuates alcohol-induced liver injury in the baboon. *Hepatology*. 1990; 11: 165-172.
- Lieber CS, DeCarli LM. Hepatotoxicity of ethanol. *J.Hepatol.* 1991b; 12:394-401.
- Lieber CS. The influence of alcohol on nutritional status. *Nutr.Rev.* 1988b; 46:241-254.
- Lin RC, Smith RS, Lumong L. Detection of a protein-acetaldehyde adducts in the liver of rats fed alcohol chronically. *J.Clin.Invest.* 1988; 81: 615-619.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall LJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 1951; 193: 265-275.
- Macdonald CM, Dow J, Moore MR. A possible protective role for sulphhydryl compounds in acute alcoholic liver injury. *Biochem.Pharmacol.* 1977; 26: 1529-1531.
- Majid K, Hilden M. Elevated levels of lead in alcoholic liver disease. *Int.Arch.Occup.Health.* 1973; 35: 61-65.
- Mahaffey KR, Goyer RA, Wilson MH. Influence of ethanol ingestion on lead toxicity in rats fed inocaloric diets. *Arch.Environ.Health.* 1974; 28: 217-222.
- Maines MD, Kappas A. The induction of haem oxidation in various tissues by trace metals-evidence for the catabolism of endogenous haem by hepatic haem oxygenase. *Ann.Clin.Res.* 1976; 8: 39-46.
- Marver HS, Tachydy DF, Pariroth MG, Collins A. Aminolevulinic acid synthetase: studies in liver homogenates. *J.Biol.Chem.* 1966; 241: 2803-2809.
- Mauzerall D, Granick S. The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J.Biol.Chem.* 1956; 219: 435-446.
- Maxwell JD, Meyer UA. Effect of lead on hepatic δ -aminolaevulinic acid synthetase activity in the rat: a model for drug sensitivity in intermittent acute porphyria. *Eur.J.Clin.Invest.* 1976; 6: 373-379.
- May BK, Bawden MJ. Control of heme biosynthesis in animals. *Semin.Hematol.* 1989; 26: 150-156.
- May BK, Shanker CR, Bawden MJ, Cox TC. Molecular regulation of 5-aminolevulinic synthase. *Mol.Biol.Med.* 1990; 7: 405-421.
- McCull KSL, Wallace AM, Moore MR, Thompson GG, Goldberg A. Alterations in haem biosynthesis during the human female menstrual cycle: Studies in normal subjects and patients with latent and active acute intermittent porphyria. *Clin.Sol.* 1982; 62: 183-191.

- McCull KRL, Thompson GG, Moore MR, Goldberg A. Acute ethanol ingestion and haem biosynthesis in healthy subjects. *Kur.J.Clin.Invest.* 1980; 10: 107-112.
- McCull KRL, Moore MR, Thompson GG, Goldberg A. Abnormal haem biosynthesis in chronic alcoholics. *Kur.J.Clin.Invest.* 1981; 11: 461-468.
- Meredith PA, Moore MR. Effects of zinc on erythrocyte delta aminolevulinic dehydratase in man. *Int.Arch.Occup.Environ.Health.* 1980; 45: 163-168.
- Meredith PA, Moore MR, Goldberg A. Erythrocyte delta-aminolevulinic acid dehydratase activity and blood protoporphyrin concentrations as indices of lead exposure and altered haem biosynthesis. *Chn.Sci.* 1979; 56: 61-69.
- Minluk K, Moniuszko-Jakoniuk J, Kulikowska K, Omiojaniuk N. The interactions of copper, lead and ethanol in rats: effects on some biochemical parameters of blood. *Pol.J.Pharmacol.Pharm.* 1989; 41: 273-280.
- Mitchell RA, Drake JR, Wittlin LA, Rejont TA. Erythrocyte porphobilinogen synthase (delta aminolevulinic dehydratase) activity: a reliable and quantitative indicator of lead exposure in humans. *Chn.Chem.* 1977; 23: 105-111.
- Moore MR, Meredith PA, Goldberg A, Carr K, Toner P, Lawrie TDV. Cardiac effects of drinking water of rats. *Clin.Sci.Mol.Med.* 1975; 49: 337-341.
- Moore MR. Lead poisoning. *Sem.Dermatol.* 1986; 5: 169-177.
- Moore MR, Disler PB. Chemistry and biochemistry of the porphyrins and porphyrias. *Clin.Dermatol.* 1985; 3: 7-23.
- Moore MR. Metabolismo de las porfirias en enfermedades no porfíricas. *JANO.* 1991; XI: 56-69.
- Mukerji S, Pimstone N.R. Tissue-Specific expression of uroporphyrinogen decarboxylase may be important in genesis of porphyria cutanea tarda. *Nether.J.Med.* 1993; 42: A28.
- Muller-Korberhard U, Vincent SH. Commentary. Concepts of home distribution within hepatocytes. *Biochem.Pharmacol.* 1985; 34: 719-725.
- Muñoz JJ, Roca C, Santos JL, Arroyo M, Enriquez de Salamanca R. Effect of zinc or s-adenosyl-l-methionine on long term administration of low doses of lead to rats. *Pharmacol.Toxicol.* 1994; (en prensa).
- Murciá P, Mourelle M. Characterization of membrane fraction lipid composition and function of cirrhotic rat liver. *J.Hepatol.* 1992; 14: 16-21.
- Mudd SH, Poole JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism.* 1975; 24: 721-735.
- Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, González FJ. The P450 superfamily: update of new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA.Cell.Biol.* 1991; 10: 1-14.
- Needleman III, Schell A, Ballinger D, Leviton A, Allred RN. The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. *N.Engl.J.Med.* 1990; 322: 83-88.
- Ohnishi K, Lieber CS. Reconstitution of the microsomal ethanol-oxidizing system: qualitative and quantitative changes of cytochrome P-450 after chronic ethanol consumption. *J.Biol.Chem.* 1977; 252: 7124-7131.
- Okuno F, Arai M, Sujita K, Hirano Y, Eto S, Ishii H. Alterations in hepatic δ -aminolevulinic acid synthase and heme oxygenase activity in rat chronically treated with ethanol. *Acta.Hepatol.Jpn.* 1989; 30: 315-319.
- Omaso K, Sakurai H, Higashi T, Hosoda K, Teruya K, Suzuki Y. Reevaluation of urinary

- excretion of coproporphyrins in lead-exposed workers. *Int.Arch.Occup.Environ.Health*. 1988; 60: 107-110.
- Orton JM, Doehr SA, Bond C, Johnson H, Pappas A. Urinary excretion of porphyrins and porphyrin intermediates in human alcoholics. *Q.J.Stud.Alcohol*. 1963; 24: 598-609.
- Paik WK, Kim S. Metilación de proteínas: Resultados de tres décadas de investigación. En: Papel de la S-Adenosil-L-Metionina en biología celular y patología. Mato JM (ed). Jarpyo; Madrid 1990. pp: 49-61.
- Parras F, Patler JL, Kzpelota C. Lead-contaminated heroin as a source of inorganic-lead intoxication. *N.RagL.J.Med*. 1987; 316:755.
- Parsons PJ, Reilly AA, Hussain A. Observational study of erythrocyte protoporphyrin screening test for detecting low lead exposure in children: impact of lowering the blood lead action threshold. *Clin.Chem*. 1991; 37: 216-225.
- Parsons S, Yang PL, Di Silvestro R. Role of zinc in resistance to hepatotoxicity in rats. *EASRB.J*. 1992; 6: A1092.
- Piroha BA, Srivastava G, Borthwick IA, Brooker JD, May BK, Elliott WH. Effect of heme on the activity of chick embryo liver mitochondrial δ -aminolevulinate synthase. *FEBS.Lett*. 1984; 166: 298-300.
- Pohflitzpatrick MB, Piomelli S, Young P, Hsu H, Harber LC. Rapid quantitative assay for erythrocyte porphyrins. *Arch.Dermatol*. 1974; 10: 225-230.
- Ponka P, Schulman HM. Regulation of heme synthesis in erythroid cells by iron delivery from transferrin. En: Porphyrins and Porphyrins. Nordmann Y. (ed). INSERM/John Libbey. Paris 1986. pp:55-67.
- Potluri R, Astrin KH, Wetmur JG, Bishop DP, Desnick RJ. Human δ -aminolevulinate dehydratase: chromosomal localization to 9q34 by in situ hybridization. *Hum.Genet*. 1987; 76:236-239.
- Poulson R. The enzymic conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX in mammalian mitochondria. *J.Biol.Chem*. 1976. 251: 3730-3733.
- Prico J, Grudzinsky Aw, Craswell PW, Thomas BJ. Bone lead measurements in patients with chronic renal disease studied over time. *Arch.Environ.Health*. 1992; 47: 330-335.
- Rabinowitz MB, Wetherill GW, Kopple JD. Lead metabolism in the normal humans: stable isotope studies. *Science*. 1973; 182: 725-727.
- Rood DJ, Orronius S. The role of methionine in glutathione biosynthesis by isolated hepatocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun*. 1977; 77: 1257-1264.
- Regina M, Korhonen VP, Smith TK, Alakujala L, Rioranta TO. Methionine toxicity in the rat in relation to hepatic accumulation of S-adenosylmethionine: Prevention by dietary stimulation of the hepatic transsulfuration pathway. *Arch.Biochem.Biophys*. 1993; 300: 598-607.
- Royes H. Colestasis Intrahepática del embarazo: clínica y tratamiento. En: Papel de la S-Adenosil-L-Metionina en biología celular y patología. Mato JM (ed). Jarpyo; Madrid 1990. pp: 95-112.
- Rogan WJ, Reigart JR, Gladen BC. Association of ALA-dehydrase levels and ferrochelataze inhibition in childhood lead exposure. *J.Pediatr*. 1986; 109: 60-64.
- Romeo PH, Raich N, Dubart A, Beaupain D, Mattai MG, Goorsens M. Molecular cloning and tissue-specific expression analysis of human porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen decarboxylase. En: Porphyrins and Porphyrins. Nordmann Y (ed). INSERM/John Libbey. Paris 1986; 134: 35-44.

- Rosen JF. Health effects of lead at low exposure levels. Expert consensus and rationale for lowering the definition of childhood lead poisoning. *Am.J.Dis.Child.* 1992; 146: 1278-1281.
- Rosen JF, Chesney RW, Hamstra AJ, DeLuca HF, Mahaffey KR. Reduction in 1,25 dihydroxyvitamin D in children with increased lead absorption. *N.Engl.J.Med.* 1980; 302: 1128-1131.
- Rosal R, Costin KA, Garcia-Webb P. Effect of occupational lead exposure on lymphocyte enzymes involved in heme biosynthesis. *Clin.Chem.* 1990; 36:1980-1983.
- Sachs L. Applied statistics. A Handbook of techniques. Springer-Verlag. Nueva York 1984. pp: 303-306.
- Sakai T, Ushio K. A simplified method for determining erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase (P5N) activity by HPLC and its value in monitoring lead exposure. *Br.J.Ind.Med.* 1986; 43: 839-844.
- Sánchez-Fructuoso A, Santos JL, Pontanellas A, Cano M, Morán MJ, Trobo JI, Barriontos A, Enriquez de Salamanca R. Efecto del EDTA sobre las alteraciones de la biosíntesis del hemo inducidas por el plomo en ratas. *Rev.Exp.Anim.* 1993; 4: 92.
- Sánchez-Fructuoso A, Blanco J, Arroyo M, Cruceyra A, Torralbo A, Peces R, Barriontos A. Distribución del plomo en el organismo tras intoxicación experimental en ratas. *Nefrología.* 1992; 12:A25.
- Sanguineti P, Dompé M, Mantovani S. Ritmi circadiani nell'escrezione urinaria delle coproporfirine e dell'acido delta-aminolevulinico. *Ann.Ist.Super.Sanità.* 1978; 14: 601-606.
- Santos JL, A Pontanellas, A Sánchez, MJ Morán, P Naranjo, M Arroyo, Enriquez de Salamanca R. Metabolismo del hemo en pacientes con insuficiencia renal crónica e impregnación por plomo. *An.Med.Int.* 1993; nº extraordinario I: 51.
- Sassa S. Control of heme biosynthesis in erythroid cells. En: In vivo and in vitro erythropoiesis: The friend system. Rossi GB (ed). Elsevier. Amsterdam 1980. pp:219-228.
- Sassa S, Granick S, Kappas A. Effect of lead and genetic factors on heme biosynthesis in the human red cell. En: The biological role of porphyrins and related structures. Adler AD (ed). New York Academy of Sciences. Nueva York 1975; pp: 419-440.
- Sassaroli M, Da Costa R, Vuorinen H, Kissinger J. Distribution of non-heme porphyrin content of individual erythrocytes by fluorescence image cytometry and its application to lead poisoning. *Cytometry.* 1992; 13: 339-345.
- Sayre JW. Control of lead exposure in childhood. Are we doing it correctly? *Am.J.Dis.Child.* 1992; 146: 1275-1278.
- Schüller A. Alcohol y enfermedad. RUDRMA. Madrid 1991.
- Schwartz S, Stephenson B, Sarkar D, Freyholtz H, Ruth G. Quantitative assay of erythrocyte "free" and zinc-protoporphyrin: clinical and genetic studies. *Int.J.Biochem.* 1980; 12: 1053-1057.
- Shannon MW, Graef JW. Lead intoxication in infancy. *Pediatrics.* 1992; 89: 87-90.
- Sharma G, Nath R, Gill KD. Effect of ethanol on cadmium-induced lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat liver. *Biochem.Pharmacol.* 1991; 42: S9-S16.
- Sieg I, Doss M, Kandels H, Schneider J. Effect of alcohol on δ -aminolevulinic acid dehydratase and porphyrin metabolism in man. *Clin.Chim.Acta.* 1991; 202: 211-218.
- Slepker LJ, Ford M, DeKock R, Kramer S. Purification of bovine protoporphyrinogen oxidase: Immunological cross-reactivity and structural relationship to ferrochelatase. *Biochim.Biophys.Acta.* 1987; 913: 349-358.

- Sills MR, Mahaffey KR, Silberfeld KK. The long-term effect of exposure to low doses of lead in childhood. *N.Engl.J.Med.* 1991; 324: 416-417.
- Smith AG, Francis JK. Investigations of rat liver uroporphyrinogen decarboxylase. Comparisons of porphyrinogens I and III as substrates and the inhibition by porphyrins. *Biochem.J.* 1981; 195: 241-250.
- Smith KM. General features of the structure and chemistry of porphyrin compounds. *Kn: Porphyrins and metalloporphyrins.* Smith KM (ed). Elsevier. Amsterdam 1975. pp: 3-58.
- Smith MT, Loveridge N, Willis RD, Chayon J. The distribution of glutathione in rat liver lobule. *Biochem.J.* 1979; 182: 103-108.
- Solomon LR, Crouch JY. δ -aminolevulinic acid dehydratase in rat liver: Studies on the effects of ethanol, acetaldehyde, and B6 vitamins. *J.Lab.Clin.Med.* 1990; 116: 228-236.
- Spinsky H, Kera Y, Penttila KK, Israel Y, Lindron KO. Depletion of hepatic glutathione by ethanol occurs independently of ethanol metabolism. *Alcoholism.* 1988; 12: 224-228.
- Srivastava G, Northwick IA, Maguire DJ, Kiferink CJ, Bawdon MJ, Mercer JPB, May BK. Regulation of δ aminolevulinic synthase mRNA in different rat tissues. *J.Biol.Chem.* 1988; 263: 5202-5204.
- Srivastava G, Brooker JD, May BK. Haem control in experimental porphyria. The effect of haemin on the induction of δ -aminolevulinic synthase in isolated chick-embryo liver cells. *Biochem.J.* 1980; 188: 781-788.
- Stadtman TC. Selenium-dependent enzymes. *Ann.Rev.Biochem.* 1980; 49: 93-110.
- Stansson JA, Lauwerys RR, Buchet JP, Nulplitt CJ, Rondia D, Vanrenterghem Y, Amery A. Impairment of renal function with increasing blood lead concentrations. *N.Engl.J.Med.* 1992; 327: 151-156.
- Stramentinoll G, Gualano M, Ideo G. Protective role of S-adenosyl-L-methionine on liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Biochem.Pharmacol.* 1978; 27: 1431-1433.
- Stramentinoll G. Pharmacologic aspects of S-Adenosyl methionine. *Am.J.Med.* 1987; 83: 35-42.
- Sun J, Wang J, Liu J. Effects of lead exposure on porphyrin metabolism indicators in smelter workers. *Biomad.Environ.Sci.* 1992; 5: 76-85.
- Sutherland GK, Baker K, Callan DF, Hyland VJ, May BK, Bawdon MJ, Healy HM, Borthwick IA. δ -aminolevulinic synthase in at 3p21 and thus not the primary defect in X-linked sideroblastic anemia. *Amer.J.Hum.Genet.* 1988; 43: 331-335.
- Tacker SH, Hoffman DA, Smith J, Steinberg K, Zaok M. Effect of low-level body burdens of lead on the mental development of children: Limitations of meta-analysis in a review of longitudinal data. *Arch.Environ.Health.* 1992; 47: 336-346.
- Takotani S, Inakawa J, Nakahashi Y, Tokunaga R. Structure of the human ferrochelatase gene. Exon/intron gene organization and location of the gene to chromosome 18. *Kur.J.Biochem.* 1992; 205: 217-222.
- Tallman S, Prpic-Majic D, Kexic S. In vivo study on lead and alcohol interaction and the inhibition of erythrocyte delta-aminolevulinic acid dehydratase in man. *Scand.J.Work.Environ.Health.* 1984; 10: 239-244.
- Tophly TR, Wagner G, Hedman R, Piper W. Effects of metals on haem biosynthesis and metabolism. *Fed.Proc.* 1977; 104: 12-17.
- Teaschke R, Gorys-Könemann C, Daldrop T, Goerz G. Influence of chronic alcohol consumption on hepatic haem and porphyrin metabolism. *Biochem.Pharmacol.* 1987; 36: 1133-1138.

- Tomokuni K, Ichiba M. Tolerance to lead-induced porphyrin metabolic disorders following lead pretreatment in mice. *Toxicol.Lett.* 1990; 54: 215-220.
- Tomokuni K, Ichiba M, Hirai Y. Effect of lead exposure on some biological indices related to porphyrin metabolism and the activity of erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase in the mice. *Arch.Toxicol.* 1989; 63: 23-28.
- Tomokuni K, Ichiba M, Hirai Y. Elevated urinary excretion of beta-aminoisobutyric acid and delta-aminolevulinic acid (ALA) and the inhibition of ALA-synthase and ALA-dehydrase activities in both liver and kidney in mice exposed to lead. *Toxicol.Lett.* 1991; 59: 169-173.
- Trémollières J, Carré L. Etudes sur les modalités d'oxidation de l'alcool chez l'homme normal et alcoolique. *Rev.L'Alcool.* 1961; 7: 202-227.
- Tschudy DP, Marver HS, Collins A. A model for calculating messenger RNA half-life: Short-lived messenger RNA in the induction of mammalian delta-aminolevulinic acid synthetase. *Biochem.Biophys.Res.Comun.* 1965; 21: 480-487.
- Tsukamoto I, Yoshinaga T, Sano S. Zinc and cysteine residues in the active site of bovine liver delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Int.J.Biochem.* 1980; 12: 751-756.
- Tsutsumi M, Lasker JM, Shimizu M, Rosman AS, Lieber CS. The intralobular distribution of ethanol inducible cytochrome P45011E1 in rat and human liver. *Hepatology.* 1989; 10: 437-446.
- Turk DS, Schonfeld DJ, Cullen M, Rainey P. Sensitivity of erythrocyte protoporphyrin as a screening test for lead poisoning. *N.Engl.J.Mod.* 1992; 326: 137-138.
- Valberg LS, Flanagan PR, Ghent CN, Chamberlain MJ. Zinc absorption and leukocyte zinc in alcoholic and nonalcoholic cirrhosis. *Dig.Dis.Sci.* 1985; 30: 329-333.
- Valentine WN, Flak K, Puglia DR, Harris SR, Adams WS. Hereditary hemolytic anemia with human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. *J.Clin.Invest.* 1974; 54: 866-879.
- Velich VR, Lumeng L, Li TK. Vitamin B6 metabolism in chronic alcohol abuse. The effect of ethanol oxidation on hepatic pyridoxal-5-phosphate metabolism. *J.Clin.Invest.* 1975; 55: 1026.
- Vendemiato G, Altomare F, Trizio T, LoGrazio C, DiPadova C, Salerno MT, Carriero V, Albano O. Effects of oral S Adenosyl-L-methionine on hepatic glutathione in patients with liver disease. *Scand.J.Gastroenterol.* 1989; 24: 407-415.
- Vilfa J, Entrela J, Guerri C, Romero F. Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. *Biochem.J.* 1980; 188: 549-552.
- Walter T, Kovalsky SJ, Stekel J. Effect of mild iron deficiency on mental development scores. *J.Pediatr.* 1983; 102: 519-522.
- Westerlund J, Pudak M, Schraiber WR. A rapid and accurate spectrophotometric method for quantification and screening of urinary porphyrins. *Clin.Chem.* 1988; 34: 345-351.
- Wotmur JG, Kaya AH, Plewinaka M, Debnick RJ. Molecular characterization of the human delta-aminolevulinic acid dehydratase 2 (ALAD²) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. *Am.J.Hum.Genet.* 1991; 49: 757-763.
- Williams R, Lieber CS. The role of SAMe in the treatment of liver disease. *Drugs.* 1990; 40 supplement 3:1-2.
- Wolfson SJ, Bartczak A, Bloer JR. Effect of endogenous heme generation on 5-aminolevulinic acid synthase activity in rat liver mitochondria. *J.Biol.Chem.* 1979; 254: 3543-3546.
- World Health Organization. Environmental Health Criteria 1985. Lead- Environmental aspects. WHO Geneva 1989.
- Yamamoto M, Hayashi N, Kikuchi G. Evidence for the transcriptional inhibition by heme of the

synthesis of δ -aminolevulinate synthase in rat liver. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1982; 105: 985-990.

Yamamoto M, Hayashi N, Kikuchi G. Regulation of synthesis and intracellular translocation of δ -aminolevulinate synthase by heme and its relation to the heme saturation of tryptophan pyrrolase in rat liver. *Arch.Biochem.Biophys.* 1981; 209: 451-459.

Yang CM, GP Carlson. Effects of glutathione conjugation in rat liver and lung. *Biochem.Pharmacol.* 1991; 41: 923-929.

Yip R, Norris TN, Anderson AS. Iron states of children with elevated blood lead concentrations. *J.Pediatr.* 1983; 98: 922-925.

Yoshinaga T, Sano S. Coproporphyrinogen oxidase. II. Reaction mechanism and role of tyrosine residues in the activity. *J.Biol.Chem.* 1980; 255: 4727-4731.

Zwenns WCM, AC Franssen, Wijmans MJ. Use of zinc protoporphyrin screening individuals for exposure to lead. *Chn.Chem.* 1990; 36: 1456-1459.