

Estudio *in vitro* del efecto del plomo en la biosíntesis de porfirinas

AURA JUDITH PÉREZ-ZAPATA*, MA. LUISA VEGA-BARRITA y
RAÚL URIBE-HERNÁNDEZ

Laboratorio de Citopatología Ambiental
Departamento de Morfología
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN
Prol. Carpio y Plan de Ayala, Col. Sto. Tomás
Apartado Postal 42-186, 11340 México D.F.

PÉREZ-ZAPATA, A. J.; MA. L. VEGA-BARRITA y R. URIBE-HERNÁNDEZ, 1998. Estudio *in vitro* del efecto del plomo en la biosíntesis de porfirinas. *An. Esc. nac. Cienc. biol.*, Méx., **44**:127-139.

RESUMEN: El 60% del grupo hemo es sintetizado en la médula ósea, 15% en el hígado (que puede aumentar hasta el 70% en condiciones patológicas), en los riñones el 10% y en otros el 15%.

El hígado utiliza del 40 al 65% de este grupo en la síntesis del citocromo P450, en citocromos mitocondriales el 30%, en el citocromo b5 el 20% y en las catalasas del 10% al 15%.

La concentración de porfirinas puede aumentar por efecto del Pb en las enzimas ALAD y ferroquelatasa que intervienen en la biosíntesis del grupo prostético hemo.

El objetivo de este trabajo fue conocer la concentración letal 50 (CL₅₀) y las concentraciones subletales a las cuales el plomo tiene efecto tóxico sobre la biosíntesis del grupo hemo *in vitro*, indicado por la baja en la actividad de ALAD y el aumento de porfirinas en los hepatocitos.

Se aislaron y cultivaron *in vitro* hepatocitos de rata Wistar macho, los cuales se intoxicaron con acetato de plomo por 24 horas, las porfirinas se cuantificaron por espectrofluorimetría, la actividad de ALAD por espectrofotometría de luz visible y el plomo por absorción atómica. La CL₅₀ encontrada fue de 1×10^{-4} M, se emplearon concentraciones subletales de 5×10^{-7} a 6×10^{-6} M. Se observó una alta correlación positiva del plomo con las porfirinas, $r = 0.91$ ($p < 0.01$), y una relación inversa con la actividad ALAD, confirmando la relación observada entre el plomo, las porfirinas y ALAD en los eritrocitos humanos, que indica un daño bioquímico en la intoxicación por plomo.

INTRODUCCIÓN

El plomo es un elemento que tiene múltiples efectos adversos en los diferentes sistemas y órganos de animales y humanos. Ejerce su acción tóxica por inhibición de la actividad de enzimas principalmente de las necesarias para la síntesis del grupo hemo, éste es de gran importancia como constituyente de los citocromos, de hemoproteínas tisulares (mioglobina) y de la hemoglobina (Corey y Galvao, 1989). Se ha estudiado en forma particular la inhibición del grupo hemo en el sistema hematopoyético humano en relación con la producción de hemoglobina (Granick y cols., 1972; Piomelli, 1973; Chisolm, 1964). Este grupo tiene una distribución aproximada de 60% en la médula ósea, 15% en el hígado (que puede ampliarse hasta el 70% en condiciones patológicas), en el riñón 10% y en otros de 15%.

*Becario COFAA-IPN.

El hígado utiliza del 40 al 65% del grupo hemo en la síntesis del citocromo P450, en citocromos mitocondriales el 30%; en el citocromo b5 el 20% y en las catalasas del 10% al 15%.

Se ha observado que el citocromo P450 es más abundante en el hígado de vertebrados, lo que indica una importante actividad en la biotransformación y detoxificación de agentes extraños.

Los citocromos mitocondriales están relacionados con la producción de energía; en el caso de los hepatocitos las hemoproteínas cobran mayor importancia debido a que también están implicadas en el metabolismo del glucógeno. La síntesis de éstas puede estar disminuida por efecto del plomo en la producción del grupo hemo. El hígado presenta una gran susceptibilidad a ser dañado por agentes químicos, debido a que es el órgano principal del metabolismo de sustancias tóxicas endógenas y exógenas, las cuales se presentan en concentraciones superiores a las que se alcanzan en otros tejidos (Balazs, 1981).

El plomo inhibe principalmente la actividad de la enzima citoplásmica deshidratasa del ácido δ -aminolevulínico (ALAD) y de la enzima mitocondrial ferroquelatasa o hemosintetasa. La acumulación del ácido δ -aminolevulínico (ALA) y de porfirinas es característica de la intoxicación por plomo (Corey y Galvao, 1989). En estudios *in vivo* la inhibición de ALAD es muy pronunciada, con un 50% de inactivación en concentración de plomo de 16 $\mu\text{g/ml}$ de sangre y 90% de inactivación con 55 $\mu\text{gPb/100ml}$ de sangre (Reigart y Whitlock, 1976; Stockman, 1975; Wada, 1973). Otra enzima en la cual se observa un claro efecto de inhibición es la hemosintetasa, enzima mitocondrial que inserta el hierro en la protoporfirina IX para formar el grupo hemo. La concentración de los sustratos respectivos de estas enzimas aumenta con el incremento en la concentración de plomo (Singhal y Thomas, 1980).

Se han realizado estudios *in vitro* de la acumulación de porfirinas en hepatocitos de embriones de pollo tratados con plaguicidas (Nichol y Angel, 1984), dicha acumulación fue ampliamente probada. Los cultivos primarios de hepatocitos de rata adulta han permitido investigar la regulación del citocromo P450 (Lindsay y cols., 1991; Evarts, 1984; Donato y cols., 1990). También se han utilizado para probar la citotoxicidad de diversos agentes que actúan sobre el metabolismo hepático y se han mostrado sus efectos *in vitro* (Ekwall y Acosta, 1982).

El objetivo de este trabajo es conocer las concentraciones subletales a las cuales el plomo tiene efecto tóxico sobre la biosíntesis del grupo hemo indicado por la baja en la actividad de ALAD y el aumento de porfirinas en los hepatocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos y materiales. Colagenasa tipo IV, insulina, d-biotina, coproporfirina I, δ -ALA, APDC, obtenidos de *Sigma Chemical Co.* (St. Louis Mo.). Suero de ternera, medio mínimo esencial *Eagle* (MEM) de *In Vitro* (México); Rojo de fenol, rojo neutro, celita, etilendiaminotricloroacético (EDTA), metilisobutilcetona (MIBK), *MERCK* (Alemania); otros reactivos mencionados más adelante fueron de grado analítico y se obtuvieron de J.T. Baker (México).

Solución eliminadora-Tris. Se preparon 100 ml de una solución eliminadora-Tris (TD)10X con NaCl 8g, KCl 3.75 g, NaH_2PO_4 0.1 g, Trismabase 3 g y 1 ml de rojo

de fenol al 1%. Se diluyeron todos los componentes en 80 ml de agua desionizada y se añadieron 15 ml de HCl 1N. La solución se aforó a 100 ml y se guardó en una botella de vidrio de 100 ml con tapón de rosca.

Solución TD 1X salina. Se diluyó el contenido de una botella con solución TD 10X en 80 ml de agua desionizada. La solución se ajustó a pH 7.4-7.5 con HCl a 37°C, se aforó a un litro con agua desionizada, la solución se repartió en botellas con tapón de rosca de 100 ml, se esterilizó en autoclave a 15 lb por 15 min y se guardó a temperatura ambiente.

Glucosa 100X. Se agregaron 20 g de glucosa poco a poco y con agitación a 80 ml de TD 1X, y se aforó a 100 ml con TD 1X, la solución se filtró en millipore y se almacenó en el refrigerador en alícuotas de 10 ml.

Cultivo de hepatocitos. El hígado se obtuvo de rata macho Wistar con un peso de 180 a 200 g, se tomó 1 ml de glucosa 100X y se agregó a 100 ml de TD 1X salina para obtener una concentración final de: 5.5 mM de glucosa, 137 mM de NaCl, 50 mM de KCl, 0.4 mM de Na₂HPO₄, 25 mM de Tris-HCl pH 7.4 y 0.01% de rojo de fenol.

El hígado se perfundió con la solución eliminadora-Tris (TD) anterior a 37°C durante tres min, a una velocidad de flujo de 15 ml/min y por 10 min con 100 unidades/ml de colagenasa tipo IV en solución TD a 37°C.

Las células se dispersaron en 20 ml de MEM 1X con 7% de suero de ternera, 5 µg/ml de insulina y 0.1 µM d-biotina (disuelta en medio de cultivo MEM). Las células en suspensión fueron filtradas a través de una malla de nylon y se dejaron sedimentar durante 10 min, se descartó el sobrenadante, los hepatocitos se resuspendieron en 5 ml de medio MEM y se depositaron 10.8×10^6 por pozo en una placa de 24 pozos (Berry y Friend, 1969; Borenfreund y Puerner, 1984; Kuri y Mendoza, 1989).

Concentración letal 50 (CL₅₀). La determinación de la CL₅₀ nos permite saber en qué concentración el tóxico produce un 50% de muerte celular, para esto se utilizaron cinco concentraciones de acetato de plomo para realizar posteriormente la cuantificación del metal.

Los hepatocitos se cultivaron como se describe antes y se incubaron por 24 horas a 37°C, en atmósfera de CO₂, al término de dicho periodo se les agregaron 1.3 ml de las soluciones con las concentraciones de acetato de plomo: 0.03×10^{-4} M, 0.06×10^{-4} M, 0.30×10^{-4} M, 1.0×10^{-4} M y 6.7×10^{-4} M, se incubaron nuevamente en las mismas condiciones durante 24 horas; se eliminó la solución y los cultivos se lavaron con solución salina balanceada de Hank (SSBH); se agregó medio de cultivo con 50 µg/ml de rojo neutro y se incubaron a 37°C durante tres horas. Posteriormente las células se lavaron con solución de formol 40%-calcio 10% (10 ml formaldehído al 40% y 10 ml cloruro de calcio anhidro 10% en 80 ml de H₂O desionizada) durante dos a tres min, se extrajo el colorante con una mezcla de ácido acético-etanol (1 ml de ácido acético en 100 ml de etanol al 50%) durante 15 min a temperatura ambiente, agitando suavemente. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Zeiss Mod. PM2DL a una longitud de onda de 540 nm. Se dejaron en la placa pozos testigo y blanco de reactivos (Borenfreund y Puerner, 1984).

Cuantificación de plomo. Los hepatocitos fueron cultivados y después intoxicados por 24 horas como se describe antes, se utilizaron concentraciones de acetato de plomo

subletales a partir del resultado de la prueba de la CL_{50} . Se agregaron 1.3 ml de las soluciones siguientes: 0.50×10^{-6} M, 0.70×10^{-6} M, 2.0×10^{-6} M, 4.0×10^{-6} M y 6.0×10^{-6} M. Se eliminó el medio con el tóxico y se agregaron 20 μ l de EDTA al 0.05% para lavar las células (dos veces). En seguida se realizó una predigestión con 1 ml de HNO_3 concentrado, a temperatura ambiente durante 12 horas, después una digestión completa con calentamiento suave en una parrilla eléctrica a $65^\circ C$. Los residuos se recogieron con 2 ml de HNO_3 al 10%, los blancos de reactivos se sometieron al mismo tratamiento.

Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica *Perkin Elmer* modelo 3110, con llama aire-acetileno a una longitud de onda de 283.3 nm, con una ventana de 0.7 nm y límite de detección de 0.01 μ g Pb/ml. El instrumento se calibró con una solución estándar de 20 μ g Pb/ml, se leyó directamente la concentración para obtener μ gPb/ 10.8×10^6 células (Zintherhofer, 1971).

Cuantificación de porfirinas. Se cultivaron hepatocitos en las mismas condiciones y se intoxicaron por 24 horas, con las soluciones de concentraciones subletales de plomo mencionadas antes. Se eliminó el medio y las células se lavaron con EDTA al 0.05%, se pasaron a un tubo de 12×100 mm con 100 μ l de una suspensión de celita al 5% en solución salina para estabilizar las moléculas de porfirinas y se añadieron 2 ml de solución 4:1 de acetato de etilo-ácido acético, agitando durante 10 seg en un vortex, se centrifugó durante un min a 1,500 rpm y el sobrenadante se pasó a otro tubo, al que se le agregaron 2 ml de ácido clorhídrico 1.5 N y se agitó durante 10 min, se separó la fase acuosa con una pipeta y se midió la concentración de porfirinas en un espectrofluorómetro *Perkin Elmer* modelo L5-2B a una longitud de onda de excitación de 405 nm y 610 nm de emisión, con una velocidad de barrido de 120 nm/min, con límite de detección de 0.0005 μ g/ml. Se calibró el instrumento con una solución estándar de coproporfirina I de 5 μ g/ml (Piomelli, 1973).

Cálculo de resultados:

$$\mu\text{g porfirina}/10.8 \times 10^6 \text{ cél} = Fx \frac{Cs}{Fs} \times \frac{2.5}{0.02} \times \frac{1}{1.11}$$

Fx = Fluorescencia del problema

Cs = Concentración del estándar = 0.05 μ g/ml

Fs = Fluorescencia del estándar = 55 μ g/ml

2.5 = Vol. final

0.02 = Vol. de la muestra

1 = Factor de conversión para el volumen final de 1 ml

1.11 = Factor de conversión de fluorescencia de coproporfirina I a porfirinas.

Determinación de la actividad de ALAD. Los hepatocitos fueron cultivados e intoxicados como se describe antes, con las concentraciones subletales de plomo, las células se lavaron con EDTA al 0.05% dos veces, se resuspendieron con 250 μ l de solución salina balanceada de Hank (SSBH) y se llevaron a $37^\circ C$ en baño maría, se agregó 1 ml de δ -ALA 0.01 M, preparado en solución amortiguadora de fosfatos pH 7, se agitó e incubó durante una hora. Al término de este tiempo se suspendió la reacción con 1 ml de ácido tricloroacético al 10% y 50 μ l de solución saturada de sulfato de cobre.

Enseguida se centrifugó a 2,500 rpm durante cinco min. Se tomó 1 ml del sobrenadante y se agregó 1 ml del reactivo de Ehrlich (paradimetilamino benzaldehído 1g, ácido acético 34 ml y ácido perclórico 16 ml). Después de cinco min se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de luz visible Zeiss Mod. PM2DL, a una longitud de onda de 555 nm. El equipo se ajustó a cero con un blanco de reactivos (Weissberg y cols., 1971).

Cálculo de la actividad enzimática:

$$\mu\text{g PBG/hr}/10.8 \times 10^6 \text{ céls.} = DO \times 100 \times 131.48$$

DO = Densidad óptica

100 = Para llevar a 100 ml de cultivo celular

$$131.48 = \frac{3.55 \times 2 (\text{dil. en el medio})}{0.051 (\text{vol. medio}) \times (\text{tiempo})} \times \frac{1}{0.036 (\text{coef. ext. PBG})} \times 2$$

El análisis de correlación de los resultados se realizó con el programa Stagraphics V. 4.

En todas las determinaciones se utilizaron cinco concentraciones y un testigo; cada resultado representa el promedio de tres mediciones, como se indica al pie de las tablas. Los mismos resultados se utilizaron para el análisis estadístico y para las gráficas.

Las probabilidades (p) que se mencionan en la tabla V, corresponden al análisis de varianza efectuado para cada una de las regresiones.

RESULTADOS

Los hepatocitos de rata adulta recién aislados se adherieron a la superficie de plástico de la placa de cultivo, mostrando una densidad de crecimiento del 100% a las 24 hrs, formando cordones de células con morfología cuboidal (Fig. 1). Después de que fueron intoxicadas durante 24 horas, las células mostraron alteración morfológica: menor refringencia en relación con las no tratadas y forma irregular (Fig. 2), la concentración de acetato de plomo que produjo este efecto fue de 6.0×10^{-6} M.

En la tabla I se muestran los resultados del cálculo de la CL_{50} para el acetato de plomo con 24 hrs de exposición, en donde se observa que el 50% de viabilidad se obtiene en la concentración de plomo de 1×10^{-4} M, las concentraciones menores en un décimo de ésta se consideran subletales (tabla III). En la tabla II se presentan los resultados de la absorción de plomo por los hepatocitos, en donde se observa la relación entre la concentración de exposición y la cantidad de metal absorbida (tabla IV); en el análisis de correlación se obtuvo un coeficiente alto de $r = 0.99$ con $p < 0.001$ (tabla V). Para las porfirinas los resultados se muestran en la tabla III, se presentó también una alta correlación de la concentración de plomo con la concentración de porfirinas (Fig. 5). Los resultados obtenidos del análisis de correlación se muestran en la tabla V, se obtuvo un coeficiente $r = 0.91$ ($p < 0.01$). Los resultados de la determinación de ALAD se muestran en la tabla IV; se observó una importante correlación inversa (Fig. 6), los resultados del análisis de correlación también se muestran en la tabla V ($r = -0.80$, $p < 0.05$).

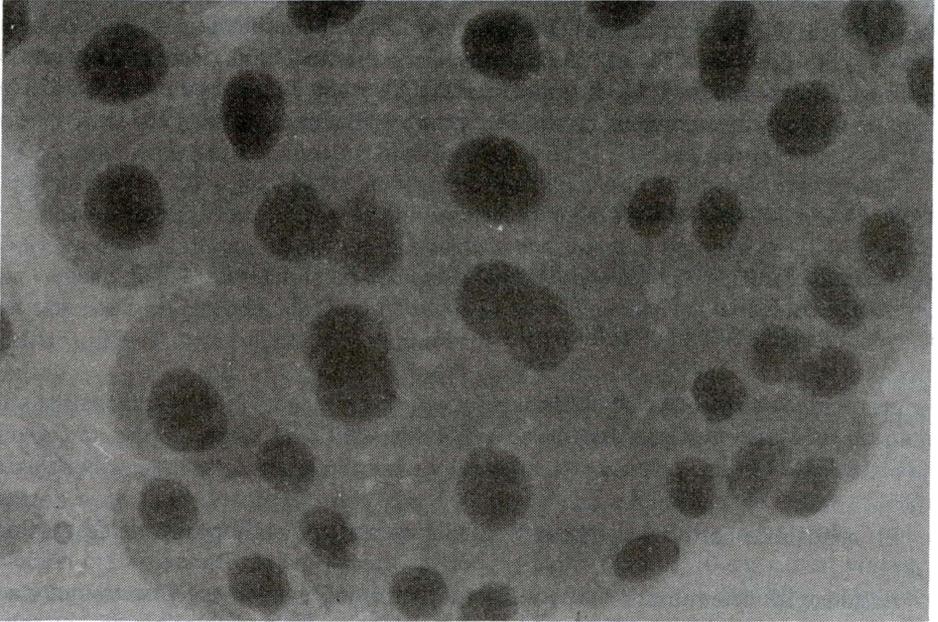


FIG. 1. Hepatocitos de rata adulta aislados y cultivados por 24 horas, formando cordones 40 X.

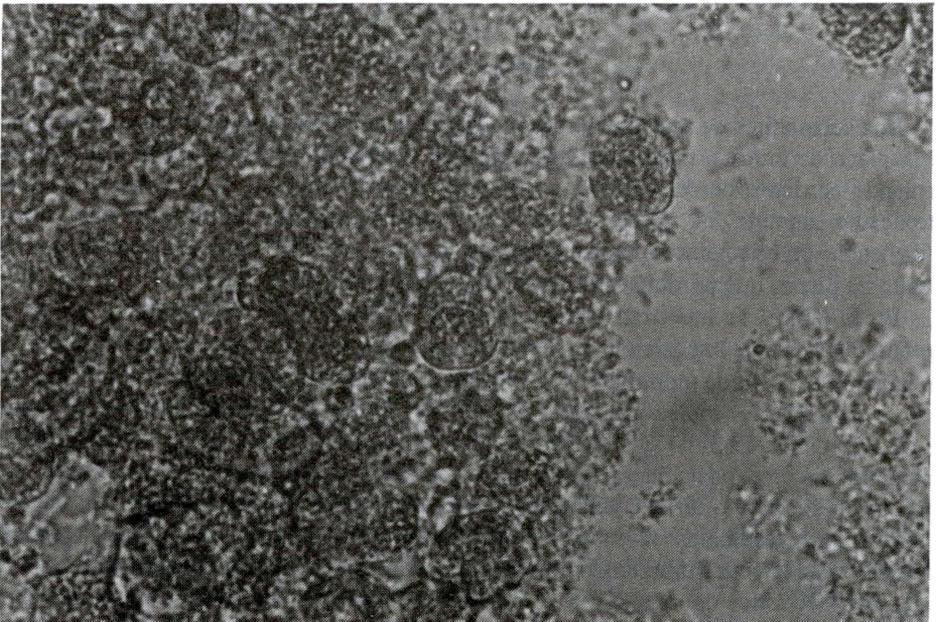


FIG. 2. Hepatocitos de rata adulta intoxicados con acetato de plomo por 24 horas, en donde se observa alteración morfológica: menor refringencia que las no tratadas y forma irregular 10 X.

DISCUSIÓN

Para atribuir el efecto del plomo sobre la vía de biosíntesis de las porfirinas, que como se sabe se lleva a cabo una parte en la mitocondria y otra en el citoplasma, se asume que el tóxico establece contacto con la molécula blanco; esto se comprobó al cuantificar el plomo absorbido después de haber intoxicado a las células con concentraciones molares de acetato de plomo, que a una concentración de 33.8×10^{-6} M no tiene efecto en la viabilidad celular (Pagannuzi y cols., 1981). La estrecha correlación ($r = 0.99$ y $p < 0.001$) entre la concentración de plomo y la cantidad absorbida por las células indica el paso del metal con las características de un proceso de transporte pasivo pues no se produce la saturación, ya que no hay un comportamiento asintótico en la curva (Fig. 4). Este proceso se ha observado en otras células como eritrocitos o células del epitelio intestinal (Blair y cols., 1979; Simons, 1986).

TABLA I. Determinación de la CL_{50} con acetato de plomo durante 24 horas de exposición^a.

Concentración molar de Pb	% Viabilidad celular
0.03×10^{-4}	90
0.06×10^{-4}	83
0.30×10^{-4}	66
1.00×10^{-4}	50
6.70×10^{-4}	40
Control	100

^a Promedio de tres repeticiones.

TABLA II. Absorción de plomo por los hepatocitos^a.

Exposición Concentración molar de Pb	Absorción $\mu\text{gPb}/10.8 \times 10^6$ céls
0.50×10^{-6}	0.8
0.70×10^{-6}	0.6
4.0×10^{-6}	2.4
6.0×10^{-6}	3.4
Control	0.0

^a Promedio de tres repeticiones.

TABLA III. Concentración de porfirinas en las células^a.

Concentración molar de Pb	µg porfirinas/10.8×10 ⁶ células
0.50 × 10 ⁻⁶	0.47
0.70 × 10 ⁻⁶	0.43
2.0 × 10 ⁻⁶	0.69
4.0 × 10 ⁻⁶	0.76
6.0 × 10 ⁻⁶	0.81
Testigo	0.42

^a Promedio de tres repeticiones.TABLA IV. Actividad de ALAD relacionada con la exposición al plomo^a.

Concentración molar de Pb	µg porfobilinogeno/hr/10.8×10 ⁶ células
0.50 × 10 ⁻⁶	210.3
0.70 × 10 ⁻⁶	189.0
2.0 × 10 ⁻⁶	144.6
4.0 × 10 ⁻⁶	105.1
6.0 × 10 ⁻⁶	131.4
Testigo	210.3

^a Promedio de tres repeticiones.TABLA V. Resultados del análisis de correlación^a.

Pb-Pb	Porf.-Pb	ALAD-Pb
$r = 0.99$	$r = 0.910$	$r = -0.80$
$b = 0.50$	$b = 0.067$	$b = -14.8$
$a = 0.34$	$a = 0.450$	$a = 195.2$
$p < 0.001$	$p < 0.010$	$p < 0.05$

^a Promedio de tres repeticiones.

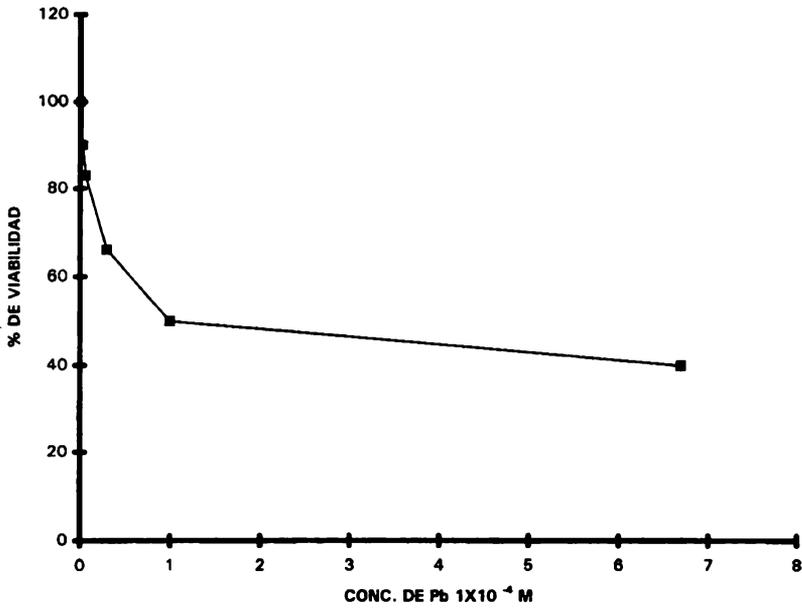


FIG. 3. Viabilidad celular con acetato de plomo (CL_{50}).

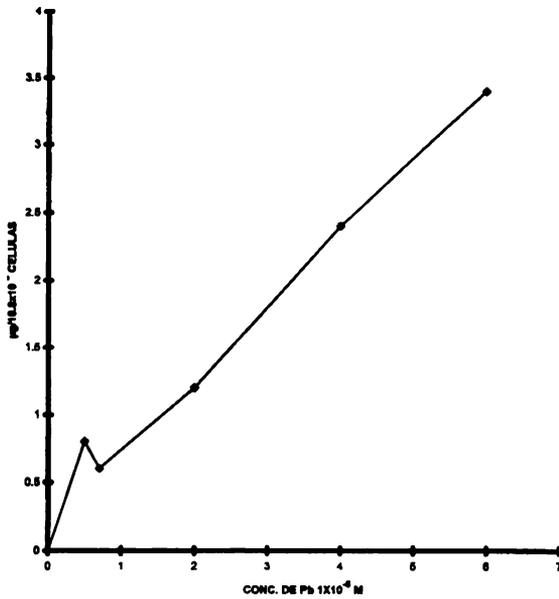


FIG. 4. Relación del plomo administrado y absorbido.

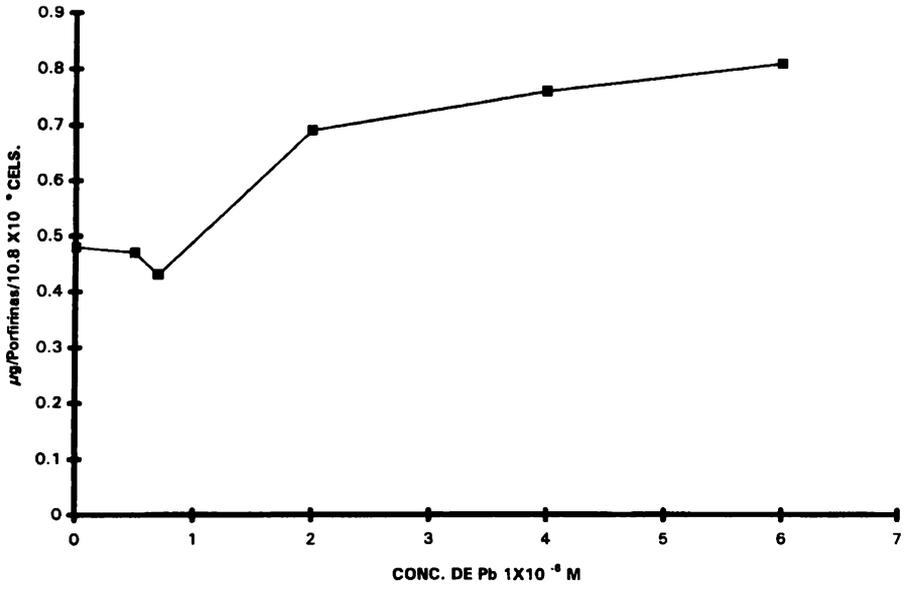


FIG. 5. Relación plomo-porfirinas.

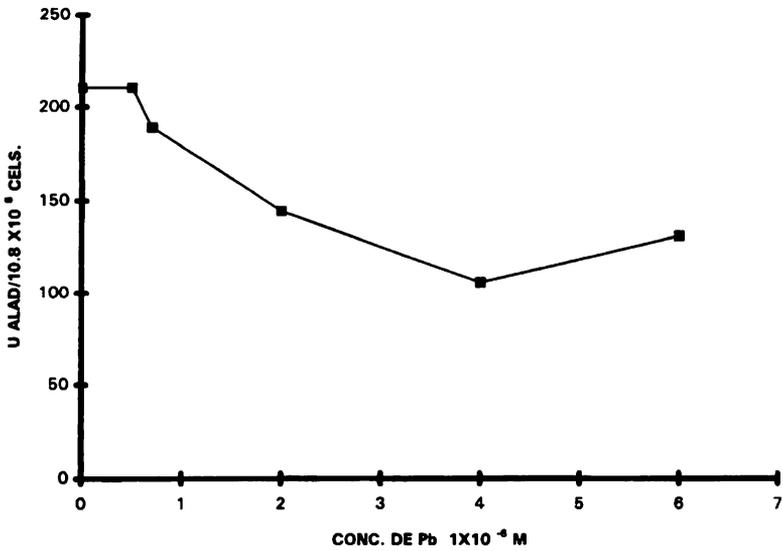


FIG. 6. Relación plomo-ALAD.

Es importante mencionar que la tasa de absorción (b = pendiente de la recta) obtenida de la ecuación de regresión fue de 50%; no se presenta dentro de la célula la concentración total de exposición, hay que tomar en cuenta que en el proceso de transporte pasivo hay flujo del catión hacia ambos lados de la membrana; el plomo penetra también por transporte activo, utilizando los transportadores de otros cationes y también ocurre la salida del mismo del interior de la célula (Simons, 1986).

La correlación directa de las porfirinas ($r = 0.91$ y $p < 0.01$) con la concentración de plomo, presenta un incremento exponencial de las mismas a partir de 2×10^{-6} M de plomo (Fig. 5) esta relación se ha observado también en otras células como es el caso de los eritrocitos y los hepatocitos de embriones de pollo (Piomelli, 1973; Strand y Manning, 1972; Granick y cols., 1975).

La actividad de ALAD presenta una fuerte correlación inversa con las concentraciones de plomo ($r = -0.80$ y $p < 0.05$). La tasa de inhibición (b) es de -14.8 U de actividad de ALAD por cada μg de plomo (Fig. 6). La actividad de la enzima en ausencia de plomo es de 195.2 unidades, bajo las condiciones del cultivo. Esta misma relación se ha observado en otras células, como los eritrocitos humanos (Piomelli, 1973), eritrocitos de rata (Kajimoto y cols., 1982) y en hepatocitos en cultivo (Strand y Manning, 1972).

A diferencia de los eritrocitos, en el caso de los hepatocitos se requiere la síntesis constante del hemo para los citocromos mitocondriales y el citocromo P450, lo que le da un importante significado toxicológico a nuestros resultados (Hammond y Dietrich, 1990).

La enzima ALAD presenta en su sitio activo grupos ditiol, los cuales en presencia del plomo se oxidan a disulfuro con la consecuente inactivación de la enzima (Burns y Godwin, 1991). Puesto que esta enzima es citoplásmica su inhibición es directa debido al transporte constante del tóxico en estas células. Es importante mencionar que la inhibición de ALAD, produce la acumulación de δ -ALA cuyo grupo enólico desencadena la formación de radicales libres (especies oxidativas), las que producen grave daño celular por lipoperoxidación (Batlle, 1993).

Por lo antes mencionado, nos parece importante señalar que este trabajo constituye un modelo para el estudio de los efectos del plomo y de otros cationes.

SUMMARY

The liver synthesizes 15% of the haeme group (in pathological conditions up to 70%), from this 40 to 65% is needed for the synthesis of cytochrome P450, 30% for mitochondrial cytochromes, 20% for cytochrome b5 and 10 to 15% for catalases. The concentration of porphyrines could be augmented by action of lead on enzymes ALAD and ferroquelatase that intervene in biosynthesis of haeme group. The purpose of this investigation was to find the LC_{50} and sublethal concentrations at which lead has toxic effect on the biosynthesis of haeme *in vitro*, demonstrated by the diminution of ALAD activity and elevation of porphyrines in hepatocytes.

In vitro hepatocytes of Wistar male rats were isolated and cultivated and were intoxicated with lead acetate during 24 hours. Porphyrines were quantified by spectrofluorometry, ALAD activity by spectrophotometry and lead by atomic absorption spectroscopy. The LC_{50} was 1×10^{-4} M. Sublethal concentrations were 5×10^{-7} to 6×10^{-6} M. The correlation between lead and porphyrines was very high, $r = 0.91$ ($p < 0.01$), the correlation with ALAD was negative.

This results confirm the relation observed in human erythrocytes for ALAD, porphyrines and lead in the intoxication by this metal.

BIBLIOGRAFÍA

- BALAZS, T., Hepatic reactions to chemicals, In: Toxicology principles and practice. Volume 1: Edited by Andrew L. Reeves. Wiley-Interscience, New York EUA 1981. pp. 93-106.
- BATLLE, A. M., 1993. Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy a model for carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol.*, **20**:5-22.
- BERRY, M. N. and FRIEND, D. S., 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell. Biol.*, **43**:506-520.
- BLAIR, J. A.; COLEMAN, I. P. L. and HILBURN, M. E., 1979. The transport of lead cation across the intestinal membrane. *J. Physiol.*, **286**:343-350.
- BURNS, C. B. and GODWIN, I. R., 1991. A comparison of effects of inorganic and alkyl lead compounds on human erythrocytic δ -Aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) activity *in vitro*. *J. Appl. Toxicol.*, **11**(2),103-110.
- BORENFREUND, E. and PUERNER, J. A., 1984. A Simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. *J. Tissue Culture Methods*, **9**:7-9.
- CHISOLM, J. J. JR., 1964. Disturbances in the biosynthesis of heme in lead intoxication. *J. Pediatr.*, **64**:174.
- COREY, G. y GALVAO, F., 1989. Plomo. Serie de vigilancia ambiental, No. 7, ECO, OPS, OMS, PP. 150.
- DONATO, M. T.; GÓMEZ, L. J. and CASTELL, J. V., 1990. Drug metabolizing enzymes in rat hepatocytes co-cultured with cell lines. *In vitro cell. Dev. Biol.*, **26**:1057-1062.
- EVARTS, R. P., 1984. Regulation of heme metabolism and cytochrome P450 levels in primary culture of rat hepatocytes in a defined medium, *Biochem. Pharmacol.*, **33**(4):565-569.
- EKWAL, B. and ACOSTA, D., 1982. *In vitro* comparative toxicity of selected drugs and chemicals in HeLa cells, Chang liver cells and rat hepatocytes. *Drug and Chem. Toxicol.*, **5**(3):219-213.
- GRANICK, S.; SASSA, S.; GRANICK, J. L.; LEVERE, R. D. and KAPPAS, A., 1972. Assays for porphyrine, δ -aminolevulinic acid dehydratase, and porphyrinogen synthetase in microliter samples of whole blood. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**:2381-2385.
- GRANICK, S.; SINCLAIR, P.; SASSA, S. and GRIENINGER, G., 1975. Effects by heme, insulin and serum albumin on heme and protein synthesis in chick embryo liver cells cultured in a chemically defined medium, and a spectrofluorometric assay for porphyrin composition. *J. Biol. Chem.*, **250**:9215-9225.
- HAMMOND, P. B. and DIETRICH, K. N., 1990. Lead exposure in early life. Health consequences. *Rev. Env. Cont. Tox.*, **115**:91-124.
- KAJIMOTO, M. and KONDO, M., 1982. Increase of δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in rat erythrocytes in lead poisoning. *Arch. Toxicol.*, **52**:1-11.
- KURI, H. W. and MENDOZA, F. T., 1989. Cultivation of adult rat hepatocytes on 3T3 cells: expression of various liver differentiated functions. *Different.*, **41**:148-157.
- LINDSAY, C. K.; CHENERY, R. J. and HAWKSWORTH, G. M., 1991. Primary culture of rat hepatocytes in the presence of dimethyl sulphoxide. *Biochem. Pharmacol.*, **42**:517-525.
- NICHOL, A. W. and ANGEL, L. A., 1984. A comparative study of porphyrin accumulation in tissue cultures of chicken embryo hepatocytes treated with organophosphorous pesticides. *Biochem. Pharmacol.*, **33**(15):2511-2515.
- PAGANNUZI, A.; SILANO, V. and ZUCCO, F., 1981. Toxicology investigations with cell culture systems. *Toxicol.*, **20**:91-153.
- PÉREZ-ZAPATA, A. J.; LEVY-PÉREZ, V. A. y GIL-RODRÍGUEZ, A. M., 1990. Las porfirinas eritrocitarias y la deshidratasa del ácido δ -aminolevulinico como indice de contaminación por plomo. *An. Esc. nac. Cienc. biol.*, Méx., **33**:211-218.

- PÉREZ-ZAPATA, A. J. y LEVY-PÉREZ, V. A., 1991. Toxicidad del plomo ambiental sobre la biosíntesis de las porfirinas eritrocitarias. *Bioquimia*, **16**(64):14-17.
- PIOMELLI, S., 1973. A micromethod for zinc protoporphyrin in erythrocytes. *Biochem. Med.*, **22**:214-237.
- REIGART, J. R. and WHITLOCK, N. H., 1976. Longitudinal observations of the relationships between free erythrocyte porphyrines and whole blood lead. *Pediat.*, **57**:54.
- SIMONS, T. J., 1986. Passive transport and binding of lead by human red blood cells. *J. Physiol.*, **378**:267-286.
- SINGHAL, R. L. and THOMAS, J. A., 1980. Lead toxicity. Urban & Schwarzenberg, Inc. Baltimore USA, 1980. pp.79-117.
- STOCKMAN, J. A. and WEINER, L. R., 1975. The measurement of free erythrocyte porphyrin (FEP) as a simple means of distinguishing iron deficiency from B-thalassemia trait in subjects with microcytosis. *J. Lab. Clin. Med.*, **85**:113.
- STRAND, L. J. and MANNING, J., 1972. The induction of δ -aminolevulinic acid synthetase in cultured liver cells: The effect of end product and inhibitors of heme biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **247**:2820-2835.
- WADA, O. and YANO, Y., 1973. The diagnosis of different degrees of lead absorption, in special references to choice and evaluation of various parameters indicative of an increased lead absorption. *Ind. Health*, **11**:55-59.
- WEISSBERG, J. B.; LIPSCHUTZ, F. and OSKI, F. A., 1971. δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in circulating blood cells. *New. Engl. J. Med.*, **284**:565-569.
- ZINTHERHOFER, L. J. M.; JATLOW, P. J. and FAPPIANAO, A., 1971. Atomic absorption determination of lead in blood and urine in the presence of EDTA. *J. Lab. Clin. Med.*, **78**:664-667.