

NTP 160: La ZPP como marcador biológico en la detección precoz y diagnosis del saturnismo



La ZPP comme indicateur biologique pour le dépistage précoce et la diagnose du saturnisme
ZPP as a biological indicator for the early detection and diagnosis of saturnism

Las NTP son guías de buenas prácticas. Sus indicaciones no son obligatorias salvo que estén recogidas en una disposición normativa vigente. A efectos de valorar la pertinencia de las recomendaciones contenidas en una NTP concreta es conveniente tener en cuenta su fecha de edición.

Redactor:

Adoración Pascual Benes
Ingeniero Técnico Químico

CENTRO NACIONAL DE CONDICIONES DE TRABAJO - BARCELONA

La ZPP ha venido siendo utilizada como un indicador de la exposición laboral al plomo; esta utilización se ha visto potenciada en el Reglamento para la prevención de riesgos y protección de la salud de los trabajadores por la presencia de plomo metálico y sus compuestos iónicos en el ambiente de trabajo, en el que se indica, entre otras cosas, que se considerarán admisibles plumbemias entre 70 y 80 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ siempre que el nivel de ZPP en sangre sea inferior a 20 $\mu\text{g}/\text{gr}$. de Hemoglobina. En la presente NTP se comenta la utilización de este parámetro y se exponen brevemente los procedimientos habituales para su determinación.

Introducción

Los efectos tóxicos del plomo sobre el organismo humano que fueron observados desde la antigüedad (mucho antes de ser atribuidos a la acción del metal), se manifiestan en diversos sistemas, siendo los que mejor se conocen los que se refieren al hematológico.

A grandes rasgos, el plomo produce, en el sistema hematopoyético, dos tipos de efectos relacionados entre sí: inhibición en varios de los pasos de la síntesis de la hemoglobina (Fig. 1) y cambios morfológicos de los eritrocitos con acortamiento de la vida de los mismos.

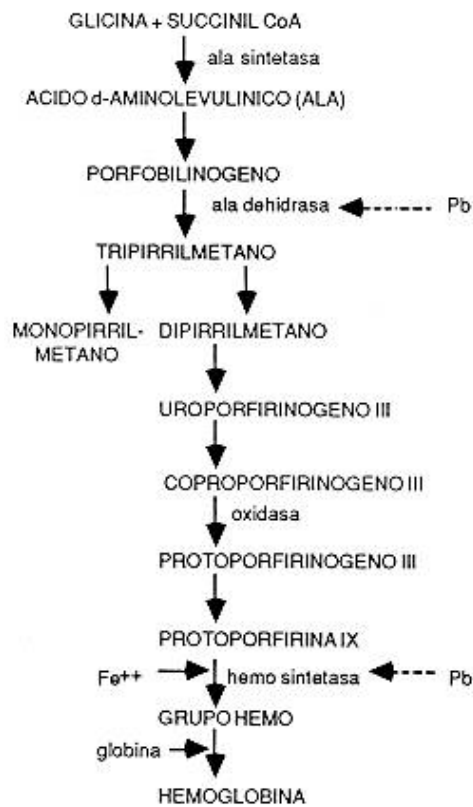


Fig. 1: Síntesis de la hemoglobina

El plomo perturba también el metabolismo del hierro y la síntesis de la globina en los hematíes.

La conjunción de todos estos efectos produce anemia detectable clínicamente.

Efectos del plomo en la síntesis del hemo

El plomo inhibe por lo menos dos de las enzimas pertenecientes a la cadena biosintética de la hemoglobina: el ALA-Dehidrasa (ALA-D), produciéndose un aumento de la concentración de ácido d-aminolevulínico (ALA) y el Hemosintetasa, bloqueándose la incorporación de ión ferroso al anillo porfirínico. Además, el plomo impide el transporte del Fe al interior de la célula lo que contribuye a dificultar aún más la entrada del metal en el anillo porfirínico; todo ello da lugar al aumento de la concentración de protoporfirina que inicialmente se pensaba era protoporfirina libre.

En 1974, Lamola y Yamane demostraron que la porfirina no se encuentra, en el caso del saturnismo y la anemia ferropénica, en forma de porfirina libre sino en forma de cinc-protoporfirina (ZPP) que se une a los tetrámeros de la globina en los puntos de enlace del hemo y permanece en el eritrocito durante todo el tiempo de vida de éste.

Recientes estudios realizados mediante cromatografía líquida de alta resolución demuestran que, aproximadamente, el 90% de la porfirina presente en la sangre de individuos intoxicados por plomo se encuentra en forma de ZPP y sólo una pequeña proporción (< 10%) se encuentra en forma de porfirina libre.

Desde el trabajo de Lamola y Yamane se han publicado numerosos trabajos en los que se estudia la relación entre la tasa de plomo en sangre y la tasa de cinc-protoporfirina eritrocitaria. En todos ellos se concluye que existe una buena correlación exponencial entre ambos parámetros (Fig. 2), e incluso la correlación es mejor cuando en lugar de un único valor de plomo en sangre se emplea la media de este parámetro en los últimos tres meses.

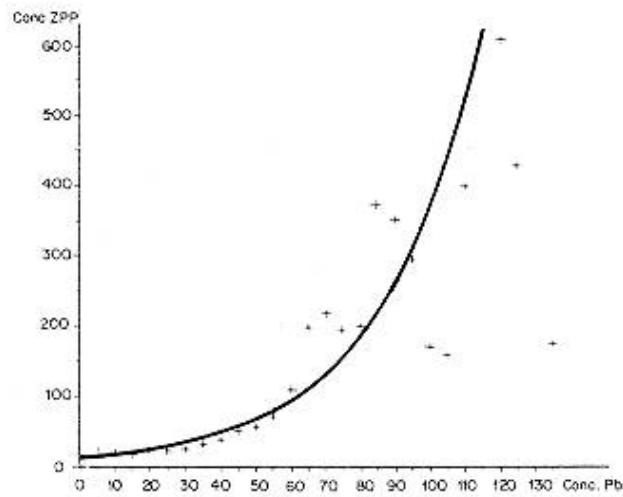


Fig. 2: Correlación de Pb y ZPP en sangre

La ZPP, al igual que la hemoglobina, permanece en el eritrocito todo el tiempo de la vida de éste; en consecuencia su manifestación está siempre retrasada con respecto a la ingesta de plomo en un lapso de tiempo igual a la vida media de los eritrocitos (tres meses). Es decir, si la plumbemia de un individuo aumenta bruscamente en un momento dado, el efecto sobre la concentración de porfirina eritrocitaria no alcanzará un estado de equilibrio hasta los tres meses. (Fig. 3)

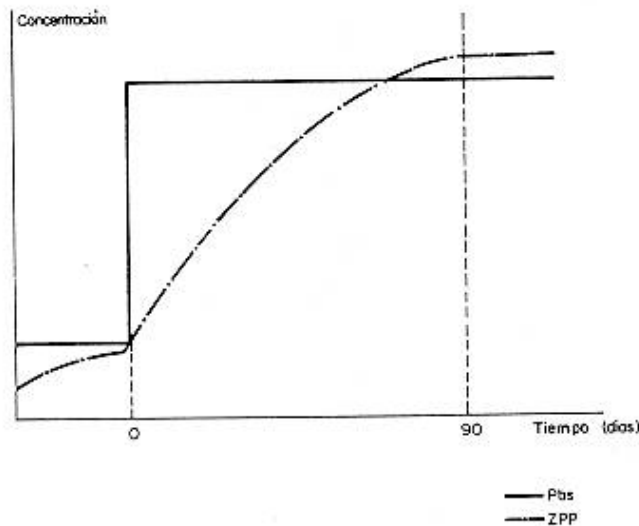


Fig. 3: Evolución de la concentración de PB y ZPP en sangre

Métodos de análisis de la cinc-protoporfirina

Lamola y Yamane, investigando las bases moleculares de la fotosensibilidad cutánea de diversas enfermedades a las que supuestamente se asocia una elevación de la tasa de porfirina libre eritrocitaria, estudian los espectros de fluorescencia de sangre de pacientes que presentan anemia ferropénica, plumbemia elevada y porfirina eritropoyética.

Cuando la medida se realiza en medio neutro, los espectros de los pacientes con plumbemia elevada y anemia ferropénica son idénticos entre sí y diferentes de los correspondientes pacientes con porfirina eritropoyética.

En cambio, cuando la medida se realiza en medio ácido los espectros correspondientes a los tres tipos de pacientes son iguales.

La única explicación del comportamiento fluorescente de la porfirina en el caso de plumbemias elevadas y anemias ferropénicas es que la porfirina no sea libre sino que se encuentre combinada con un ión metálico.

Por todo lo explicado deducimos que una propiedad característica de la ZPP es su espectro de fluorescencia, que en condiciones adecuadas nos permite resolver las bandas de fluorescencia de la ZPP y la porfirina libre; este hecho, unido a la ausencia de fluorescencia de la hemoglobina y al desarrollo reciente de la fluorescencia de óptica frontal, abre una alternativa analítica a la detección de los efectos del plomo sobre el sistema hematopoyético.

La bibliografía describe varios métodos para la determinación de cinc-protoporfirina (básicamente fluorimétricos y por cromatografía líquida de alta resolución); los métodos que permiten una aplicación masiva se reducen prácticamente a dos: el método de dilución y el método del hematofluorímetro.

Método de dilución

Se diluyen 10 µl de sangre en 5 ml de una solución de detergente (Triton X-100, tertigol) al 0,5%, se agita y se mide la intensidad de fluorescencia de la dilución coloreada a 594 nm (Excitación 424 nm).

La fluorescencia de esta solución se compara con la de un patrón secundario (por ejemplo una solución diluida de Rodamina B) y se efectúan re-estandarizaciones periódicas.

Otra forma de la realización de esta calibración sería utilizando cinc-protoporfirina pura y emplear un sistema de calibración clásico, preparando patrones directamente o por adición. Esta forma presenta la dificultad de no poder conseguir con facilidad el patrón del cinc-protoporfirina pura.

Este método es extremadamente sencillo, muy económico y muy rápido; con las modernas técnicas de automatización pueden analizarse unas cien muestras por hora.

Las muestras hasta su análisis pueden guardarse en nevera un mes y medio y periodos más largos si se guardan en congelador.

Este método permite la toma de muestra en papel de filtro, evitándose de esta forma los problemas derivados del transporte y conservación de las muestras recogidas en tubo de vidrio. También requiere disponer de un fluorímetro, que aunque es un aparato de coste alto se puede utilizar para otros tipos de análisis.

Hematofluorímetro

En 1977 se comercializó un equipo específicamente diseñado para la determinación fluorimétrica de ZPP llamado 'hematofluorímetro', consiste en un fluorímetro portátil de lectura directa, especialmente ideado para la medida rápida de la cinc-protoporfirina. Su manejo es extremadamente simple y rápido y la medida se efectúa depositando una gota de sangre, sin ningún tipo de tratamiento previo, sobre un cubreobjetos que se inserta en un porta-muestras en el que, de modo permanente, van fijados un blanco y un patrón. Se introduce el portamuestras en el instrumento y éste, automáticamente, mide y calcula la concentración de cinc-protoporfirina.

Este método es muy sencillo, económico, sumamente rápido y la instrumentación es sencilla y no costosa.

Es un método de campo, en el que se puede obtener el resultado inmediatamente después de la toma de muestras. Estas, si es necesario, se pueden guardar hasta una semana.

Este método no permite trabajos con muestras congeladas, ni analizar muestras de sangre depositadas sobre el papel de filtro y su instrumentación no puede utilizarse para otros tipos de análisis.

En resumen, los dos métodos permitan el screening masivo de grandes masas de población. Es precisamente en esta decisión, de la detección de los individuos en los que es preciso investigar una posible impregnación de plomo, donde la cinc-protoporfirina supone una auténtica novedad prevencionista.

La elección de una u otra metodología depende de las necesidades concretas del usuario.

La cinc-protoporfirina como test de screening en la detección del saturnismo

Hay que tener en cuenta que al utilizar la cinc-protoporfirina como test screening para la detección de individuos sospechosos de saturnismo se asume necesariamente un cierto riesgo de error. A causa del carácter experimental de la determinación analítica (que implica por tanto una cierta imprecisión) y de la variabilidad de las respuestas individuales, aparecerán siempre casos falsos negativos (individuos que realmente tienen tasas elevadas de plomo en sangre y pasan desapercibidos en el test) y casos falsos positivos (individuos con plumbemia baja y son detectados en el test). Ambos están íntimamente ligados y reducir el número de unos implica necesariamente aumentar el número de los otros. En la tabla 1 se ilustra esta interrelación.

Tabla 1: Test de Screening de la ZPP

CONCENTRACION DE CORTE DE ZPP (µg/100 ml)	93	76	62	48	34	26
FALSOS POSITIVOS (PbS = 40 µg/100 ml)	19%	27%	35%	50%	65%	78%
FALSOS NEGATIVOS (PbS = 60 µg/100 ml)	50%	40%	30%	20%	10%	5%

Valor normal de ZPP $\bar{x} = 23 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$
Margen superior de normalidad ($\bar{x} + 2 \text{ SD} = 40 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$)

Un campo en el que el test de la cinc-protoporfirina tiene un interés evidente es en el de las revisiones escolares.

Tanto el método de dilución, como el del hematofluorímetro, precisan un volumen de muestra de sangre muy pequeño, unido a que pueden aplicarse a grandes masas de población, hacen de este test un método ideal para la detección de niños expuestos a plomo.

Como el defecto de Fe provoca también el aumento de la cinc-protoporfirina, permito detectar también ferropenias que habitualmente no son detectadas hasta que alcanzan el estadio de anemias.

Bibliografía

(1) Piomelli, S.

J. Lab. Clin. Med 1973, **81**, 932

(2) Lamola, A.A. y Yamane, T.

Science, 1974, **186**, 936-938

(3) Lamola, A.A., Joselow, My Yamane, T.

Clin. Chem. 1975, **21**, 93-97

(4) Joselow, M. and Flores, J.

Filter Paper-disc Method for the determination of Zinc Protoporphyrin in Blood.

Health Lab. Science, 1977, **14**, (2) 129-132

(5) Pérez de la Ossa de Bascarán, R.

El papel de la ZPP en la detección y diagnóstico del saturnismo.

Documentos Técnicos, Nº 4, 1983. Centro de Investigación y Asistencia Técnica. Barcelona I. N. S. H. T

(6) Guillot Hernández, I.

Parámetros Biológicos de Detección de Exposición al Plomo. Tesina

Universidad de Barcelona, Facultad de Biología. Barcelona. Septiembre de 1986

(7) Smith, R., Doran, D., Mazur, M. and Bush, B.

High-Performance Liquid Chromatographic determination of protoporphyrin and zinc protoporphyrin in blood.

Journal of Chromatography 1980, **181**, 319-327

(8) Villalbi, J.R., Estany, J., Dalmau, J., Sales, C., Pascual, A., Gadea, E.

La intoxicación por plomo en la edad escolar: resultados de un cribaje mediante cinc-protoporfirina.

An. Esp. Pediatría, 1987 (Pendiente de publicación)