

MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y GENOTOXICIDAD EN TRABAJADORES CUBANOS CON EXPOSICIÓN OCUPACIONAL PROLONGADA AL PLOMO

OXIDATIVE STRESS MARKERS AND GENOTOXICITY IN CUBAN WORKERS WITH PROLONGED OCCUPATIONAL EXPOSURE TO LEAD

Claudia Pérez López ¹
Gretel Riverón Forment ²
Ibis de las Mercedes Fernández Díaz ³
Nino Pedro del Castillo Martín ⁴
Olivia Martínez Bonne ⁵
Reinaldo Gutiérrez Gutiérrez ⁶
Anamarys Pandolfi Blanco ⁷
Mildrey Cásido Rodríguez ⁸
Judith Pupo Balboa ⁹
Roberto Lardoeyt Ferrer ¹⁰
Nancy Silvia Barroso Sosa ¹¹
Arelis Jaime Novas ¹²
Lilian Villalba Rodríguez ¹³

RESUMEN

Objetivos: Determinar el comportamiento de los marcadores de estrés oxidativo y genotoxicidad en individuos expuestos ocupacionalmente, por tiempos prolongados, al plomo. **Material y método:** Fueron estudiados 57 sujetos, de ellos, 27 trabajadores con edades comprendidas entre 35 y 64 años, expuestos al plomo por períodos de 8 a 44 años. El grupo control estuvo conformado por 30 individuos, con edades comprendidas entre 36 y 65 años, sin exposición ocupacional conocida a agentes químicos o físicos. Todos los participantes fueron incluidos en el estudio luego de emitir su consentimiento informado. Los marcadores de daño oxidativo y de defensa antioxidante, fueron medidos mediante métodos espectrofotométricos. Además, se determinó el daño al ADN mediante ensayo Cometa. **Resultados:** En los trabaja-

dores expuestos se observó un incremento significativo en la concentración plasmática de peróxidos totales. Por otra parte, mostraban una disminución significativa en la actividad de la glutatión reductasa. **Conclusiones:** Los resultados de este estudio permitirán el empleo de marcadores de efecto para el seguimiento de los trabajadores expuestos al plomo.

Palabras clave: plomo, exposición ocupacional, daño oxidativo, defensa antioxidante

ABSTRACT

Objectives: To determine the behavior of markers of oxidative stress and genotoxicity in occupationally exposed individuals, for

¹ Laboratorio de Estrés Oxidativo, Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba

² Investigadora Auxiliar. Laboratorio de Estrés Oxidativo, Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba

³ Médico especialista de I grado en Medicina General Integral y de II grado en Higiene y Epidemiología, Máster en Salud de los Trabajadores, Investigadora y Profesora Auxiliar. Subdirección de Atención Médica, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba

⁴ Licenciado en Psicología, Doctor en Ciencias de la Salud, Máster en Salud de los Trabajadores. Investigador y Profesor Titular, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba

⁵ Técnica. Laboratorio de Estrés Oxidativo, Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba

⁶ Investigador Auxiliar. Laboratorio de Estrés Oxidativo. Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba

⁷ Licenciada en Tecnología de la Salud. Laboratorio de Estrés Oxidativo. Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba

⁸ Técnico. Laboratorio de Estrés Oxidativo, Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba

⁹ Doctora en Ciencias, Investigadora Agregado. Laboratorio de Estrés Oxidativo. Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba

¹⁰ Doctor en Ciencias, Profesor Titular. Centro Nacional de Genética Médica, La Habana, Cuba

¹¹ Licenciada en Tecnología de la Salud. Subdirección de Atención Médica, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba

¹² Licenciada en Bioquímica Farmacéutica, Máster en Química Farmacéutica, Investigadora Auxiliar. Departamento de Riesgos Químicos, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba

¹³ Técnica A Auxiliar de Investigación. Departamento de Riesgos Químicos, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba

Correspondencia:

Claudia Pérez López
Avenida 146 N° 3102, esquina a 31, Playa, La Habana, Cuba.
e-mail: claudia@cngen.sld.cu

Financiamiento:

Este trabajo fue suportado por el proyecto ramal 1116264, aprobado por el Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba

prolonged periods, to lead. **Method:** There were studied a total of 57 subjects, of them 27 workers aged between 35 and 64, exposed to lead for periods of 8-44 years. The control group consisted of 30 individuals, aged between 36 and 65 years, with no occupational exposure to chemical or physical agents. All participants were included in the study after signing informed consent form. Markers of oxidative damage and antioxidant defense were measured by spectrophotometric methods. Moreover, the DNA damage was determined by Comet assay. **Results:** In the exposed workers observed a significant increase in plasma concentration of total peroxides. On the other hand, they showed a significant decrease in the activity of glutathione reductase. **Conclusions:** The results of this study will allow the use of markers for monitoring effect of workers exposed to lead.

Keywords: lead, occupational exposure, oxidative damage, antioxidant defense

INTRODUCCIÓN

El plomo (Pb) es un metal pesado que por sus propiedades físico-químicas presenta varias aplicaciones y es el más comúnmente empleado en la industria, principalmente como aditivo en combustibles y en pinturas¹. Su toxicidad es de interés para la salud debido a su persistencia en el ambiente y a su elevado tiempo de vida media en el organismo². El Pb se ha relacionado con una amplia variedad de trastornos fisiológicos, bioquímicos y conductuales como el deterioro cognitivo, los desórdenes neurológicos, la hipertensión, así como la anemia, la insuficiencia renal y la debilidad neuromuscular^{3,4}.

La incorporación del plomo al organismo es fundamentalmente mediante vía respiratoria y gastrointestinal. Se conoce que entre el 40 y el 50 % del Pb inhalado puede ser transferido al torrente sanguíneo. En la sangre, la mayor parte de este metal se encuentra en los eritrocitos. Se ha demostrado que el plomo induce cambios en la composición de los eritrocitos, las proteínas de membrana y los lípidos, e inhibe la síntesis de hemoglobina, ocasionando anemia^{5,6}.

En diversos estudios epidemiológicos realizados en trabajadores con alta exposición al Pb, se han reportado asociaciones entre la exposición a este metal y los marcadores de estrés oxidativo^{7,8}. El estrés oxidativo se ha propuesto como el mecanismo molecular probable que media la toxicidad de este metal⁹. Se considera que el plomo induce un estado de estrés oxidativo mediante la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), disminuyendo los sistemas de defensa antioxidante de las células, fundamentalmente mediante la depleción del glutatión, compitiendo con algunos metales esenciales, inhibiendo enzimas antioxidantes y/o aumentando la susceptibilidad de las células a la oxidación mediante la alteración de la integridad de la membrana y la composición de ácidos grasos de la misma¹⁰.

En su gran mayoría, los estudios epidemiológicos y descriptivos realizados hasta el momento, emplean a los marcadores de estrés oxidativo como indicadores de

efecto, para analizar la toxicidad al Pb en poblaciones o en trabajadores expuestos. Sin embargo, son escasos los reportes que relacionan el daño oxidativo, la actividad de las enzimas antioxidantes y los daños al material genético, con la exposición ocupacional prolongada al Pb. En el presente estudio, se pretende profundizar en los niveles de estos marcadores en un grupo de trabajadores expuestos a bajos niveles de Pb, pero por largos períodos de tiempo.

MATERIAL Y MÉTODO

Se trata de un estudio de tipo descriptivo, con un diseño transversal, llevado a cabo por el Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores (Insat) y el Centro Nacional de Genética Médica (CNGM) entre los años 2009 y 2011.

La muestra estuvo conformada por 27 trabajadores con exposición ocupacional al Pb. Los mismos fueron entrevistados y mediante una encuesta, se recogieron los datos acerca del tiempo de exposición ocupacional (el que debía de ser superior a cinco años), los antecedentes patológicos, consumo de medicamentos y suplementos antioxidantes, así como los hábitos tóxicos como el consumo de alcohol y el tabaquismo. Además, fueron determinados los niveles de Pb en sangre como parte del chequeo periódico que se les realiza a estos trabajadores.

La población de referencia estuvo conformada por 30 individuos sanos, en los cuales se constató que no estuvieran expuestos ocupacionalmente al metal y a los que se les realizaron estudios de laboratorio clínico (pruebas de función hepática, glicemia, creatinina, lipidograma y parámetros hematológicos) para descartar la presencia de otras enfermedades que pudieran relacionarse con el estrés oxidativo (EO). Además, se verificó la no utilización de suplementos antioxidantes y hábitos tóxicos como el consumo de alcohol y el tabaquismo.

Todos los participantes fueron incluidos luego de emitir voluntariamente su consentimiento, siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en el 2013, además de ser revisado el protocolo de investigación por los comités de ética de las instituciones participantes.

En este estudio se utilizó como muestra biológica sangre venosa sistémica. La extracción se realizó en ayunas, mediante punción venosa, en los laboratorios del Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores (Insat). Se extrajeron 7 mL de sangre, los cuales se distribuyeron de la siguiente forma: 2 mL en un tubo heparinizado para el ensayo Cometa y 5 mL en un tubo con EDTA para las determinaciones de EO.

Para las determinaciones de los marcadores de EO se utilizó el plasma, el que se obtuvo por centrifugación (2500 rpm durante 5 minutos) y lisados de eritrocitos, muestras que fueron almacenadas a -20 °C hasta el momento de su procesamiento (no más de diez días). Para

la determinación del daño basal en el ADN se utilizaron linfocitos aislados de sangre periférica obtenidos por centrifugación, empleando un gradiente de Histopaque 1077.

Marcadores de daño oxidativo

1. Determinación de la concentración de malondialdehído. La concentración plasmática de malondialdehído (MDA) se determinó a partir del método descrito en el ensayo BIOXYTECH® LPO-586™ (OXIS Research, Portland, USA). Los resultados fueron expresados en $\mu\text{mol/L}$.
2. Determinación de la concentración de los productos avanzados de la oxidación de proteínas. La determinación en plasma de los productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP) se realizó mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Witko Sarsat y colaboradores ¹¹. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{mol/L}$.
3. Determinación de la concentración de peróxidos totales. La determinación de los peróxidos totales en el plasma se realizó mediante el método FOX ¹². Este ensayo colorimétrico cuantitativo se basa en la oxidación de iones ferrosos (Fe^{2+}) a iones férricos (Fe^{3+}) en condiciones ácidas, mediado por los peróxidos. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{mol/L}$.
4. Determinación del daño basal al ADN. La determinación del daño al ADN se realizó mediante el ensayo COMETA, el que permite detectar roturas de simple y doble cadena en el ADN y sitios sensibles al álcali, afectaciones que pueden ser generadas por gran variedad de agentes físicos y/o químicos ¹³. Para llevarlo a cabo, las células se inmovilizan en gel de agarosa, se lisan y se someten a electroforesis en condiciones alcalinas. Posteriormente, los núcleos obtenidos, se tiñen y se visualizan al microscopio óptico. La intensidad del daño se cuantificó en unidades arbitrarias (UA).

Marcadores de defensa antioxidante

1. Actividad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa intraeritrocitaria. La actividad intraeritrocitaria de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD1) se determinó mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Marklund S y Marklund G ¹⁴. Este es un método cinético indirecto, que se basa en la capacidad de esta enzima para inhibir la reacción de autooxidación del pirogalol. Para el cálculo de la actividad se tiene en cuenta que 1 unidad de actividad enzimática (UAE) es capaz de inhibir el 50 % de la autooxidación del pirogalol. Las unidades fueron expresadas en % de inhibición / minuto/ mL de enzima (U/mL).

2. Actividad de la enzima catalasa intraeritrocitaria. La determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT) se realizó mediante la técnica referida por Aebi H ¹⁵. Este ensayo cinético directo se basa en la medición de la variación de la densidad óptica que tiene lugar como resultado de la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las unidades de actividad enzimática fueron expresadas en mmoles de H_2O_2 transformados /minuto/mL de enzima (U/mL).
3. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa celular. La determinación de la actividad enzimática intraeritrocitaria de la Glutatión Peroxidasa celular (c-GPx) se realizó mediante la técnica referida por Paglia DE y Valentine WN ¹⁶. Las unidades de actividad enzimática fueron expresadas en mU/ml.
4. Actividad enzimática de glutatión reductasa. La determinación de la actividad enzimática intraeritrocitaria de la glutatión reductasa (GR) se realizó mediante la técnica referida por Carlberg I y Mannervik B ¹⁷. Este ensayo se basa en la oxidación de NADPH a NADP^+ , catalizada por la enzima presente en la muestra, definiéndose como 1 UAE la cantidad de enzima que es capaz de catalizar la reducción de un μmol de GSSG por minuto a pH 7,2 y 25 °C. Las unidades de actividad enzimática fueron expresadas en mU/mL.
5. Determinación de la concentración de tioles libres. La determinación de las concentraciones plasmáticas de tioles proteicos referidos como glutatión reducido (GSH) se realizó mediante la técnica referida por Sedlak J y Lidsay RH ¹⁸. El GSH presente en la muestra desproteinizada reacciona con el reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, DTNB) para rendir un compuesto coloreado que absorbe la luz a 412 nm. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{mol/L}$.
6. Determinación de la capacidad antioxidante total. La capacidad antioxidante total en el plasma fue determinada mediante el ensayo FRAP ¹². Este ensayo permite determinar la habilidad del plasma para reducir a los iones férricos a ferrosos, representando el poder antioxidante. Los resultados fueron expresados en equivalentes de mM de Fe^{2+}/L .

Análisis estadístico

En este estudio se determinaron los estadígrafos descriptivos de tendencia central para los marcadores de EO y genotoxicidad. Se compararon las medias aritméticas de cada una de las variables de respuesta para ambos grupos (expuestos y no expuestos), mediante la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes. Como criterio de significación estadística se tomó $p < 0,05$. Para el análisis estadístico nos servimos del programa SPSS versión 13.0 para Windows.

RESULTADOS

El grupo de trabajadores estuvo conformado por 14 soldados, 2 pintores, 2 laboratoristas, 3 mecánicos, 4 operarios y 2 individuos que realizaban otros trabajos, para un total de 27, con una edad promedio de 46 años (rango: 35-64 años). Los mismos tenían como promedio 21 años de exposición al Pb

(rango: 8-44 años de exposición) y niveles del metal en sangre de 19,7 µg/dL (rango: 5-52,7 µg/dL).

El grupo control estuvo conformado por 30 individuos, con una edad promedio de 47 años (rango: 36-65 años).

Como se observa en la tabla 1, la concentración de peróxidos totales estaba incrementada en los trabajadores expuestos con respecto a los controles. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos para el resto de los marcadores de daño oxidativo.

Tabla 1
Marcadores de daño oxidativo en los trabajadores expuestos y controles

Marcadores	Trabajadores expuestos (n=27)	Controles (n=22)
MDA (µmol/L)	0,75 ± 0,35	0,64 ± 0,27
PAOP (µmol /L)	44,17 ± 27,95	40,63 ± 47,56
Peróxidos totales (µmol /L)	10,08 ± 19,27 ^a	2,88 ± 5,50
Daño al ADN (UA)	35,38 ± 26,68	32,26 ± 18,31

^a Diferencia entre trabajadores expuestos y controles (p<0,05)
Los resultados están expresados como media ± desviación estándar

Como se puede apreciar en la tabla 2, la actividad de la enzima antioxidante glutatión reductasa se encuentra disminuida en comparación con la de los sujetos no expuestos. En cambio, no se observan diferencias significativas entre las actividades intraeritrocitarias de las

enzimas SOD1, CAT y GPx entre los grupos. Lo mismo sucede con la concentración de grupos tioles, referidos como glutatión reducido y con la capacidad antioxidante total a nivel plasmático.

Tabla 2
Marcadores de defensa antioxidante en los trabajadores expuestos y controles

Marcadores	Trabajadores expuestos (n=27)	Controles (n=22)
SOD1 (U/mL)	163,81 ± 29,48	166,34 ± 19,57
CAT (U/mL)	71,02 ± 27,07	70,44 ± 33,61
GPx (mU/mL)	213,52 ± 148,68	252,06 ± 125,54
GR (mU/mL)	3,02 ± 6,16 ^a	4,08 ± 3,44
Concentración de grupos tioles (µmol /L)	29,22 ± 37,39	19,79 ± 17,52
Capacidad antioxidante total (mM Fe ²⁺ /L)	0,22 ± 0,11	0,24 ± 0,08

^a Diferencia entre trabajadores expuestos y controles (p<0,05)
Los resultados están expresados como media ± desviación estándar

Cuando se analizó cuáles de estos marcadores de efecto podrían ser factores de riesgo debido a la exposición prolongada al Pb, se encontró que los trabajadores expuestos mostraban un riesgo incrementado en 3,4 veces de presentar valores elevados de MDA, producto final de la peroxidación lipídica (IC 95 %: 1,2-9,7) y de presentar 4,5 veces más reducida la capacidad antioxidante del plasma (IC 95 %: 1,2-16,5) que los individuos no expuestos, notando que, de eliminarse la exposición

al Pb, los niveles de MDA se reducirían en el 28 % en los trabajadores muestreados, así como que se normalizaría la capacidad antioxidante en el 23 % de estos individuos expuestos.

DISCUSIÓN

El Pb es un catión divalente con capacidad de unirse a grupos sulfhidrilos (-SH) presentes en proteínas, modi-

ficando de esta manera la función de ciertas enzimas y proteínas estructurales. Al respecto, se ha descrito que el Pb presente dentro de los eritrocitos interfiere en la síntesis del grupo hemo al alterar la actividad de algunas de las enzimas involucradas en este proceso^{2,19}.

El daño celular inducido por el Pb se propone que ocurre mediante dos mecanismos independientes. El primero involucra la formación directa de especies reactivas del oxígeno (ERO), incluyendo el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos, y el segundo mecanismo ocurre vía depleción de los antioxidantes celulares^{7,20}. Se ha demostrado que existe una interrelación entre estos dos mecanismos debido a que el incremento de las ERO conlleva simultáneamente a la depleción de antioxidantes^{10,21}.

Diversos estudios han comprobado que los efectos del Pb en el organismo están determinados por la concentración en sangre de dicho metal, en relación directa con el tiempo de exposición al mismo. También se conoce que todos los individuos no reaccionan de la misma manera ante una misma dosis de este metal ni presentan la misma capacidad de mantener el estado redox adecuado en el organismo²².

Los resultados obtenidos en este estudio indican que concentraciones promedio de metal de 19,7 µg/dL provocan un aumento significativo en las concentraciones de peróxidos totales a nivel plasmático, resultados que están en correspondencia con los del estudio realizado por Kasperczyk et al. en 2004²³.

La participación de los radicales libres en el mecanismo de toxicidad del Pb puede ocurrir a diferentes niveles: 1) inhibición de la enzima ácido δ-aminolevulínico deshidrogenasa (δ-ALAD) mediada por el Pb, dada por la acumulación de su sustrato δ-ALA, el cual se oxida rápidamente generándose iones superóxido (O₂⁻), radicales hidroxilo (OH[•]) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂); 2) el Pb en sí presenta la capacidad de estimular la peroxidación lipídica mediada por iones ferrosos^{19,24}.

Por otra parte, el proceso de oxidación simultánea de δ-ALA y oxihemoglobina promueve la generación de ERO dando lugar a la formación de metahemoglobina, radical δ-ALA y H₂O₂¹⁹. De esta manera, niveles elevados de δ-ALA producen peroxidación lipídica e inducen cambios en la permeabilidad mitocondrial mediante procesos mediados por calcio, además de otros efectos como el de promover la liberación del hierro presente en las moléculas de ferritina.

Numerosas enzimas han sido empleadas para evaluar el daño oxidativo inducido por el Pb, como son las actividades de la glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD1), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR)²⁵. En este estudio no se obtuvieron cambios significativos en las actividades de la SOD1, CAT y GPx, mientras que se observa una disminución significativa de la actividad de la glutatión reductasa (GR), lo que se corresponde con una investigación realizada por Garçon

et al.²⁶, donde se obtuvo una correlación negativa entre la concentración de Pb en sangre y las actividades de las enzimas antioxidantes en individuos expuestos ocupacionalmente.

La glutatión reductasa es una enzima que participa en el ciclo redox del glutatión, catalizando la reacción que lo lleva a su estado reducido. La GR posee un grupo disulfuro en su sitio activo, al cual se ha propuesto que se une el Pb, lo que resulta en la inhibición de la actividad de esta enzima. La inhibición de la GR conlleva a una disminución en la razón GSH/GSSG, lo cual aumenta la susceptibilidad al daño oxidativo²⁷.

En estudios realizados en animales expuestos al Pb, se ha demostrado que si se les suministra zinc, estos presentan actividades normales de SOD, ALAD y otras enzimas antioxidantes. Se ha propuesto a su vez que el zinc actúa como antioxidante y posiblemente como un agente quelante en la toxicidad del Pb^{28,29}. Esto podría explicar en parte que no haya variación en las actividades de las enzimas antioxidantes.

Los valores de concentración de Pb en sangre que presentaban los trabajadores expuestos analizados en este estudio son relativamente bajos, en comparación con los niveles de Pb en sangre reportados en la literatura referidos a la exposición ocupacional (40-80 µg/dL), lo que podría explicar la poca variación entre los marcadores de daño oxidativo y de defensa antioxidante observado, con respecto a los controles. Sin embargo, los marcadores que fueron significativamente diferentes en los trabajadores expuestos y los que presentan relación directa con la exposición, pueden emplearse como marcadores directos de efecto en los trabajadores, lo que permitiría realizar el seguimiento de los mismos, con el fin de mantener el control biológico, cuando las alteraciones orgánicas puedan ser todavía reversibles, y de esta forma perfeccionar el seguimiento médico periódico que se realiza a estos trabajadores.

De acuerdo a los resultados obtenidos, en investigaciones futuras, se debe profundizar en el estudio de los marcadores que constituyeron factores de riesgo debido a la exposición prolongada al plomo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nava-Ruiz C, Méndez-Armenta M. Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). Arch Neurocién (Mex). 2011;16(3):140-7.
2. Fontana D, Lascano VM, Solá N, Martínez S, Virgolini M, Mazzieri MR. Lead poisoning and pharmacological treatment. Revista de Salud Pública. 2013;17(1):49-59.
3. Sinicropi MS, Amantea D, Caruso A, Saturnino C. Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. Arch Toxicol. 2010; 84:501-20.

4. Afaf Abbass Sayed Saleh. Potential effects of some antioxidants against lead toxicity. *International Journal of Advanced Research*. 2014;2(5):824-34.
5. Ahamed M, Siddiqui MKJ. Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clinica Chimica Acta*. 2007;383:57-64.
6. Cabaravdic M., Mijanovic M., Kusturica J., Cabaravdic A. Occupational exposure of workers at gas station to inorganic lead. *Med Arch*. 2010;64(2):107-9.
7. Gurer-Orhan H, Sabir HU, Ozgunes H. Correlation between clinical indicator of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead exposed workers. *Toxicology*. 2004;195:147-54.
8. Kasperczyk S, Birkner E, Kasperczyk A, Kasperczyk J. Lipid, lipid peroxidation and 7-ketocholesterol in workers exposed to lead. *Human Exp Toxicol*. 2005;24:287-95.
9. Bechara EJH. Lead poisoning and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2004;36.
10. Martínez SA, Cancela LM, Virgolini MB. El estrés oxidativo como mecanismo de acción del plomo. Implicancias terapéuticas. *Acta Toxicológica Argentina*. 2011;19(2):61-79.
11. Witko-Sarsat V, Friendlander M, Nguyen-Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocytes activation in chronic renal failure. *J Immunol*. 1998;161:2524-32.
12. Harma M, Erel O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly*. 2003;133:563-66.
13. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*. 1997;375:183-93.
14. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974;47:469-74.
15. Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol*. 1984;105:121.
16. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70:158-69.
17. Calberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Meth Enzymol*. 1985;113:485-90.
18. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total protein bound and non-protein sulfhydryl group in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968;25:192-205.
19. Wang Q, Zhao HH, Chen JW, Hao QL, Gu KD, Zhu YX, Zhou YK, Ye LX. delta-aminolevulinic acid dehydratase activity, urinary delta-aminolevulinic acid concentration and zinc protoporphyrin level among people with low level of lead exposure. *Int J Hyg Environ Health*. 2010;213(1):52-8.
20. Patrick L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev*. 2006b;11:114-27.
21. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283(2-3):65-87.
22. Martínez SA, Simonella S, Hansen C, Rivolta S, Cancela LM, Virgolini MB. Blood lead levels and enzymatic biomarkers of environmental lead exposure in children in Córdoba, Argentina, after the ban of leaded gasoline. *Hum Exp Toxicol*. 2013;32(5):449-63.
23. Kasperczyk S, Birkner E, Kasperczyk A, Zalejska-Fiolka J. Activity of superoxide dismutase and catalase in people protractedly exposed to lead compounds. *Ann Agric Environ Med*. 2004;11(2):291-6.
24. Gautam P, Flora SJ. Oral supplementation of gossypin during lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats. *Nutrition*. 2010;26(5):563-70.
25. Pande M, Flora SJS. Lead-induced oxidative damage and its response to combined administration of lipoic acid and succimers in rats. *Toxicology*. 2002;177:187-96.
26. Garcon G, Leleu B, Zerimech F, Marez T, Hagne-noer JM, Furon D, Shirali P. Biologic markers of oxidative stress and nephrotoxicity as studied in biomonitoring of adverse effects of occupational exposure to lead and cadmium. *J Occup Environ Med*. 2004;46(11):1180-6.
27. Hoffman DJ, Heinz GH, Sileo L, Audet DJ, Campbell JK, LeCaptain LJ, Obrecht HH. *J. Toxicol. Environ. Health*. 2000;59:235-52.
28. Prasad AS. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009;12:646-52.
29. Flora SJS, Pachauri V. Chelation in metal intoxication. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7:2745-88.

Recibido: 2 de septiembre de 2014 **Aprobado:** 1º de octubre de 2015