



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

***TNF- α , estado pro-inflamatorio y su relación con la apoptosis de
leucocitos de trabajadores expuestos a plomo***

Tesis que presenta la
Q.F.B. Nadia Cristina López Vanegas

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias
En la especialidad en Bioquímica

Director de la tesis: Dr. José Víctor Calderón Salinas

Ciudad de México

Septiembre 2018.

Durante el desarrollo de este proyecto el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT con número de becario 614054 y número de beca. 456318.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica Médica del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. José Víctor Calderón Salinas.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco al Dr. José Víctor Calderón Salinas por haber dirigido este proyecto. Por admitirme en su equipo de trabajo y brindado la confianza de trabajar en su laboratorio, por su apoyo en todo momento.

A mi comité de asesores por sus acertados comentarios durante el desarrollo de esta tesis:

- Dr. Edgar Morales Ríos, Investigador del Departamento de Bioquímica, CINVESTAV
- Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV.

A CONACYT por la beca otorgada durante la maestría.

Al CINVESTAV por otorgarme la beca de obtención de grado.

A la auxiliar de Investigación Q.F.I. Margarita Marcela Rosas Flores por su apoyo y enseñanza en el trabajo experimental en el laboratorio. Porque tener a un amigo y que a la par sea compañero de trabajo es difícil de encontrar.

Agradezco a la Dra. María Maldonado Vega, por ser el vínculo principal con las personas que participaron en el estudio, por el gran apoyo y las facilidades brindadas en los muestreos.

Al Dr. Gerardo Hernández García por su paciencia en la asesoría estadística y acertados comentarios.

A las secretarías del departamento de Bioquímica Lic. Angelica González Ceja, L.R.C. Priscila González Ceja y a Lic. Ma. Del Rocío Arroyo Ruiz Velasco.

El trabajo, la dedicación y la paciencia para la culminación de esta tesis es simplemente de las personas que estuvieron conmigo. Gracias a mis papás y a mis hermanas porque sin ellos esta tesis no sería posible, gracias por su amor, apoyo y motivación, porque es de ustedes y para ustedes. Gracias a Dios por permitir un logro más en mi vida.

A Fátima Vázquez Salas por su gran apoyo moral, en el trabajo y por la gran amistad que formamos.

A Claudia Estefanía Ruiz Cascante por la colaboración en el proyecto y las historias clínicas.

A Gretter González Blanco por formar un gran equipo durante la maestría y por su amistad.

A mis compañeros de maestría Yamile, Gretter, Jessica, Liliana y Saúl.

Al equipo de trabajo del laboratorio 25 del Dpto. de Bioquímica del CINVESTAV: a la Lic. Angelica González Ceja, Margarita, Fátima, Naty, Carla, Britany, Carlos, Mireille, Sandra, Héctor.

A Luis Alberto Rivera Rivas por la motivación de seguir en los últimos meses.

A mi gran amiga Nancy Araceli Medina Medina, porque siempre ha estado conmigo.

A todas las personas que participaron y colaboraron en este proyecto. Y a todas aquellas con las que tuve contacto y participaron con una idea, con un consejo, con un trámite y demás.

***“Un gran líder no necesariamente
es quien hace grandes cosas.
Es la persona que logra que otros las hagan”***

Para el Dr. Víctor Calderón Salinas.

***Una vez más y las veces que sean:
Para mis queridos papás: Gabriela Vanegas Menchaca y
José Manuel López Menchaca.
Para mis hermanas Paulina López Vanegas y
Gabriela López Vanegas.***

***Mi querida familia
Gracias.***

Índice

| | |
|--|------|
| Abreviaturas | iii |
| Índice de tablas..... | iv |
| Índice de figuras..... | v |
| Resumen..... | vii |
| Abstract | viii |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1 El plomo..... | 1 |
| 1.2 El plomo como contaminante en la industria..... | 2 |
| 1.3 Toxicocinética y toxicodinamia del plomo | 4 |
| 1.3.1 Enzima ácido δ -aminolevulínico deshidratasa..... | 6 |
| 1.3.2 Daño oxidativo | 7 |
| 1.4 Diagnóstico de intoxicación por plomo | 8 |
| 1.4.1 Plomo en sangre | 8 |
| 1.4.2 Pruebas de daño específicas..... | 9 |
| 1.4.3 Pruebas de daño no específicas | 10 |
| 1.5 Síntomas clínicos de intoxicación por plomo..... | 11 |
| 2. Antecedentes..... | 13 |
| 2.1 Eritrocitos..... | 13 |
| 2.1.1 Eriptosis | 14 |
| 2.2 La inflamación..... | 18 |
| 2.2.1 Leucocitos | 19 |
| 2.2.2 Mediadores inflamatorios..... | 20 |
| 2.2.3 Factor de necrosis tumoral alfa..... | 21 |
| 3. Justificación..... | 24 |
| 4. Hipótesis..... | 25 |
| 5. Objetivo general | 26 |
| 5.1 Objetivos específicos..... | 26 |
| 6. Materiales y métodos | 27 |
| 6.1 Elección del tamaño de muestra | 28 |
| 6.2 Criterios de inclusión y exclusión | 29 |
| 6.3 Obtención de muestras de sangre | 29 |
| 6.4 Transporte de muestras de sangre | 30 |
| 6.5 Concentración de plomo en sangre | 30 |
| 6.6 Determinación de microhematocrito | 30 |
| 6.7 Actividad de la enzima ácido delta aminolevulínico deshidratasa (δ -ALAD)..... | 31 |
| 6.8 Lipoperoxidación en eritrocitos | 31 |
| 6.9 Externalización de fosfatilserina en eritrocitos y leucocitos | 32 |
| 6.10 Concentración de TNF- α en plasma..... | 34 |

| | |
|--|----|
| 6.11 Estimulación de TNF- α con lipopolisacárido | 34 |
| 6.12 Análisis de resultados | 35 |
| 7. Resultados | 36 |
| 7.1 Concentración de plomo en sangre | 36 |
| 7.2 Actividad δ -ALAD | 37 |
| 7.3 Relación de la concentración de plomo con respecto a la actividad de la enzima δ -ALAD..... | 37 |
| 7.4 Lipoperoxidación | 38 |
| 7.5 Relación de la concentración de plomo respecto a la lipoperoxidación..... | 39 |
| 7.6 Relación de la actividad de la enzima δ -ALAD respecto a la lipoperoxidación..... | 40 |
| 7.7 Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos | 40 |
| 7.8 Externalización de fosfatidilserina en leucocitos..... | 42 |
| 7.9 Concentración de TNF- α en plasma..... | 45 |
| 7.10 Estimulación de leucocitos con lipopolisacárido para la secreción de TNF- α | 45 |
| 7.11 Historia clínica toxicológica | 47 |
| 8. Discusión | 48 |
| 8.1 Intoxicación en trabajadores expuestos a plomo..... | 48 |
| 8.2 Plomo y actividad δ -ALAD | 50 |
| 8.3 Daño oxidativo y eriptosis..... | 51 |
| 8.4 Apoptosis de leucocitos | 54 |
| 8.5 TNF- α y estado pro-inflamatorio..... | 54 |
| 9. Conclusiones | 57 |
| 10. Perspectivas | 59 |
| 10. Referencias bibliográficas | 60 |

Abreviaturas

| | |
|------------------|---|
| Pb | Plomo |
| δ -ALAD | Enzima ácido delta aminolevulinico deshidratasa |
| PBG | Porfobilinógeno |
| ALA | Ácido aminolevulinico |
| GR | Glóbulos rojos o eritrocitos |
| Grupos SH | Grupos sulfidrilo |
| RL | Radicales libres |
| ROS | Especies Reactivas de Oxígeno |
| $O_2^{\cdot-}$ | Anión superóxido |
| H_2O_2 | Peróxido de hidrógeno |
| OH^{\cdot} | Radical hidroxilo |
| MDA | Malondialdehído |
| TBARs | Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico |
| $[Ca^{2+}]_i$ | Concentración intracelular de calcio |
| PLA ₂ | Fosfolipasa A ₂ |
| PGE ₂ | Prostaglandina E ₂ |
| AA | Ácido Araquidónico |
| AV-FITC | Anexina V-Isotiocianato de Fluoresceína |
| SSC | Side scatter |
| FSC | Forward scatter |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| LPS | Lipopolisacárido |
| ELISA | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del plomo..... | 1 |
| Tabla 2. Tipos de contaminación por plomo y sus efectos..... | 12 |
| Tabla 3. Evolución de la intoxicación crónica por plomo y aproximación temporal ante exposición ocupacional continua..... | 12 |
| Tabla 4. Características y funciones de los leucocitos de la sangre..... | 19 |
| Tabla 5. Referencias bibliográficas que reportan la asociación de TNF- α con modelo celular y en personas expuestas a plomo..... | 23 |
| Tabla 6. Porcentaje de pacientes que presentan signos y síntomas clínicos asociados a la intoxicación por plomo y estados pro-inflamatorios en trabajadores no expuestos y expuestos a plomo..... | 47 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Fig. 1. Formas de movilización del plomo..... | 3 |
| Fig. 2. Absorción, distribución, redistribución y eliminación del plomo en el organismo | 4 |
| Fig. 3. Vía biosintética del grupo hemo simplificada..... | 7 |
| Fig. 4. Mecanismos y objetivos por los cuales se genera el estrés oxidativo, cuando existe exposición a plomo..... | 8 |
| Fig. 5. Tabla de parámetros de intoxicación por plomo y mecanismos de eriptosis en trabajadores no expuestos y expuestos a plomo..... | 15 |
| Fig. 6. Indicador de eriptosis a través de la medición de externalización de fosfatidilserina en trabajadores expuestos a plomo..... | 15 |
| Fig. 7. Mecanismos moleculares del proceso apoptótico en eritrocitos. Esquema de un eritrocito en apoptosis..... | 16 |
| Fig. 8. Efecto de la intoxicación por plomo en la actividad de las enzimas fosfolipasa A ₂ y esfingomielinasa de eritrocitos de trabajadores expuestos..... | 17 |
| Fig. 9. Tabla donde se presenta el porcentaje de trabajadores no expuestos y expuestos a plomo que presentan sintomatología propia de la intoxicación por plomo..... | 18 |
| Fig. 10. Concentración de plomo en sangre determinada por voltametría en trabajadores no expuestos (n = 17) y trabajadores expuestos a plomo (n = 24)..... | 36 |
| Fig. 11. Actividad de la enzima δ -aminolevulínico deshidratasa determinada por espectrofotometría en trabajadores no expuestos (n = 17) y trabajadores expuestos a plomo (n = 24)..... | 37 |
| Fig. 12. Regresión lineal y correlación entre la concentración de plomo y actividad δ -ALAD de trabajadores no expuestos (n = 17) y expuestos a plomo (n = 24)..... | 38 |

| | |
|--|----|
| Fig. 13. Lipoperoxidación determinada a través de TBARs por espectrofotometría en trabajadores no expuestos (n = 17) y trabajadores expuestos (n = 24)..... | 39 |
| Fig. 14. Regresión lineal y correlación entre la concentración de plomo y la lipoperoxidación de trabajadores no expuestos (n = 17) y expuestos a plomo (n = 24)..... | 39 |
| Fig. 15. Regresión lineal y correlación entre la actividad δ -ALAD y la lipoperoxidación de trabajadores no expuestos (n = 17) y expuestos a plomo (n = 24)..... | 40 |
| Fig. 16. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos por citometría de flujo, en la parte superior derecha de cada figura se indica el % de células positivas a anexina-V-FITC..... | 41 |
| Fig. 17. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos medida por la unión de Anexina V-FITC por citometría de flujo en trabajadores no expuestos (n = 17) y trabajadores expuestos a plomo (n = 24)..... | 42 |
| Fig. 18. Poblaciones leucocitarias identificadas por citometría de flujo..... | 43 |
| Fig. 19. Externalización de fosfatidilserina en leucocitos por citometría de flujo, en la parte superior derecha de cada figura se indica el % de células positivas a Anexina-V-FITC..... | 44 |
| Fig. 20. Externalización de fosfatidilserina en leucocitos medida por la unión de Anexina V-FITC por citometría de flujo de trabajadores no expuestos (n = 17) y trabajadores expuestos a plomo (n = 24)..... | 44 |
| Fig. 21. Concentración de TNF- α en plasma determinada por ELISA en trabajadores no expuestos (n = 17) y trabajadores expuestos a plomo (n = 24)..... | 45 |
| Fig. 22. Concentración de TNF- α ante la estimulación de leucocitos con LPS. | 46 |
| Fig. 23. Porcentaje de trabajadores no expuestos (n = 17) y expuestos a plomo (n = 24) que presentan menor respuesta y mayor respuesta para la producción y liberación de TNF- α por leucocitos estimulados con LPS en sangre total..... | 47 |

Resumen

El plomo es un metal pesado, persistente en el ambiente, se utiliza en muchas actividades industriales, por lo que constituye un riesgo ocupacional y ambiental en trabajadores de metalúrgicas, reciclaje de baterías, vidrioado y cerámicas, que tienen medidas de seguridad deficientes. La exposición a plomo causa efectos perjudiciales a nivel bioquímico y fisiológico. Los mecanismos de daño involucran estrés oxidativo, incremento de calcio intracelular libre y aumento de apoptosis. En el presente trabajo estudiamos otros factores de daño, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), es una citocina crucial en la defensa del hospedero, la inflamación y la inducción de apoptosis. El objetivo del presente trabajo se estudió el estado clínico y molecular pro-inflamatorio, a partir de la producción y liberación de TNF- α por leucocitos de trabajadores expuestos a plomo y su relación con el proceso oxidativo y el apoptótico. Se realizó un estudio descriptivo, transversal y comparativo: un grupo de 24 trabajadores expuestos, de la industria de reciclado de baterías, se comparó con un grupo de 17 trabajadores sin antecedentes de exposición a plomo. Se realizó una historia clínica toxicológica completa y diferentes pruebas moleculares. Aprobado por los comités de ética correspondientes, los participantes aceptaron y firmaron el consentimiento informado.

Se encontró que los trabajadores expuestos presentan un incremento de 25 veces en la concentración de plomo en sangre, 85% menor actividad de la enzima δ -ALAD, 27% mayor lipoperoxidación, 60% mayor de eriptosis y 74% mayor de apoptosis de leucocitos, con respecto al grupo no expuesto, todas las comparaciones tuvieron significancia estadística. No se observaron cambios en la concentración del TNF- α , a pesar de que los signos y síntomas clínicos característicos de la intoxicación por plomo y el estado proinflamatorio están presentes en los trabajadores expuestos a plomo; sin embargo, se identificó que el 42% de estos últimos tienen menor respuesta ante el estímulo para la producción y liberación de TNF- α , ello sugiere un estado de compensación en el que los leucocitos producen y secretan menos TNF- α como mecanismo de defensa.

Abstract

Lead is a heavy metal persistent in the environment; it is used in many industrial activities such as metallurgy, battery recycling, glazing and ceramics, and it constitutes an occupational and environmental risk for workers involved in such activities, which generally have poor security measures. Exposure to lead causes harmful effects at the biochemical and physiological level. The mechanisms of damage involve oxidative stress, increased free intracellular calcium and increased eryptosis. In the present work we study the tumor necrosis factor alpha (TNF- α), which is a crucial cytokine in host defense, inflammation and the apoptosis induction.

The aim of the present work is to study the clinical and molecular pro-inflammatory state, relating the production and liberation of TNF- α by leukocytes of workers exposed to lead with the oxidative damage in erythrocytes and apoptotic process in both erythrocytes and leukocytes. A group of 24 exposed workers from the battery recycling industry was compared with a group of 17 workers with no history of lead exposure. We recorded a complete toxicological history for each patient and pertinent molecular tests were performed. This study was approved by the corresponding Ethics Committees; the participants accepted and signed an informed consent.

It was found that exposed workers have a 25-fold increase in blood lead concentration, 85% lower activity of the δ -ALAD enzyme, 27% higher lipoperoxidation, 60% higher eryptosis, 74% higher leukocyte apoptosis, with respect to the non-exposed group; all the comparisons were statistically significant. Despite the fact that clinical signs and symptoms characteristic of lead poisoning and proinflammatory state are present in the workers exposed to lead, no changes were observed in the concentration of TNF- α . However, 42% of the exposed workers had lower leukocyte response to the stimulus with LPS for the production and release of TNF- α ; this suggests that leukocytes, as a defense mechanism, reduces the production and secretion of TNF- α .

1. Introducción

1.1 El plomo

El plomo es uno de los primeros metales descubiertos por la humanidad y uno de los más empleados desde la antigüedad, continuando y aumentando su uso hasta la actualidad. Su empleo y la contaminación por dicho metal se correlacionan estrechamente con el desarrollo industrial y tecnológico. Sus propiedades físicas y químicas (Tabla 1), así como como su flexibilidad, alta maleabilidad, ductilidad y resistencia a la corrosión, ha resultado en un amplio uso en diferentes industrias como automóviles, pinturas, cerámicas, plásticos, municiones, recubrimientos de cables, fabricación de baterías, vidrio, etc. (Flora *et al.*, 2012).

Por tanto, el ser humano siempre ha estado expuesto al plomo, en un principio debido a los yacimientos naturales, posteriormente con su uso en vasijas, cerámicas, colores de origen mineral, tuberías, pinturas, aditivos antidetonantes de los combustibles y en las industrias. Actualmente, esto continúa siendo un problema de salud pública en personas laboralmente expuestas, sobre todo en países en vías de desarrollo, como México (Calderón y Maldonado, 2008).

| Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del plomo (Calderón y Maldonado, 2008) | |
|---|--------------------|
| Símbolo químico | Pb |
| Número atómico | 82 |
| Peso atómico | 207.21 |
| Valencia | 2,4 |
| Estados de oxidación | +2 y +4 |
| Electronegatividad | 1.9 |
| Radio iónico | 0.12 nm |
| Isótopos | 208, 206, 207, 204 |
| Punto de fusión | 327.4°C |
| Punto de ebullición | 1725°C |
| Densidad | 11.4 g/ml |
| Solubilidad de sales de plomo en agua | |
| | (g/100 ml) |
| Acetato | 221 |
| Cloruro | 0.99 |
| Cromato | 0.00002 |
| Nitrato | 56.5 |
| Oxido | 0.001 |
| Sulfato | 0.00425 |

1.2 El plomo como contaminante en la industria

El plomo se encuentra formando compuestos inorgánicos en diversos yacimientos naturales en toda la tierra, de donde puede ser extraído con técnicas de minería, fundición y refinación. Sin embargo, las actividades antropogénicas han hecho que el plomo se distribuya y contamine el ambiente. Existen diferentes tipos de contaminación con plomo para el ser humano, entre ellos, la laboral, paralaboral, laboral-domiciliaria, ambiental y domiciliaria. En la industria su uso es frecuente, por lo que se clasifica como contaminación del tipo laboral, la que se presenta cuando el trabajador se expone a plomo por arriba del nivel recomendado en una industria que maneja grandes concentraciones de plomo, con procesos inadecuados o por deficiencia de los sistemas de seguridad (Calderón y Maldonado, 2008).

Existen tres tipos de industrias involucradas en el empleo y procesamiento del plomo: 1) industria primaria, es la encargada de la extracción, fundición y reciclamiento de plomo; 2) industria secundaria, en la que se utilizan altas concentraciones de plomo en sus procesos, por ejemplo, las que fabrican acumuladores, baterías, colorantes, láminas de plomo para soldadura o manufactura; y 3) en la que emplean bajas concentraciones de plomo en sus procesos, por ejemplo, metal-mecánicas, fábricas de colores y juguetes, uso de pintura y soldadura (Calderón y Maldonado, 2008).

Las industrias secundarias, aquellas que emplean el plomo como materia prima esencial en sus productos, por ejemplo, las baterías, los aditivos y pinturas, son capaces de contaminar en el sitio donde son utilizados y no solo donde son fabricados, por lo que en esos sitios se puede contaminar directamente el ser humano, el ambiente, los alimentos, los animales y las plantas (Calderón y Maldonado, 2008).

El uso del plomo está asociado fuertemente a los países desarrollados, excepto en los procesos de extracción, donde se mencionan países en vías de desarrollo como Perú y México, este último está en los seis primeros lugares en producción de plomo, pero muy atrás en su uso y reciclamiento (Portal de Estadística, Statista.com, 2017). El empleo de plomo ha variado notablemente en los últimos 20 años, al 2005 la distribución de su uso: el 78% del plomo se emplea en la fabricación de baterías y acumuladores, el 7% en pigmentos y pinturas, el 6% en láminas de plomo para manufactura y el restante 9% en diferentes materiales (Calderón y Maldonado, 2008).

El plomo puede contaminar el suelo de manera natural, por desechos industriales sólidos o de basura contaminada con plomo; las diversas sales de plomo pueden ser solubles o solubilizarse al entrar en contacto con otros componentes atmosféricos y disolverse en el agua, que puede contaminar arroyos, ríos, lagos, lagunas, mantos subterráneos, etc. Parte de la contaminación de los desechos líquidos contaminados se precipita y forma parte de los sedimentos sólidos, que al secarse forman parte de la tierra con la que se tiene contacto (Calderón y Maldonado, 2008).

Los desechos sólidos de industrias y yacimientos naturales no solo contaminan el agua, sino también la tierra, se pueden generar polvos, humos, vapores o aerosoles que contienen sales del contaminante y con ello generar una contaminación del aire, que puede ir de metros a kilómetros, siendo mayor la distancia alcanzada a mayor velocidad de los vientos, mayor temperatura y a menor tamaño de la partícula y menor humedad. La vía de contaminación más importante es la aérea, ya sea de yacimientos naturales o de desechos industriales (Gillis *et al.*, 2012) que no cuentan con los sistemas de protección ambiental adecuados, esta vía de contaminación es más difícil de controlar, reconocer, medir y evitar en el ambiente (Fig. 1).

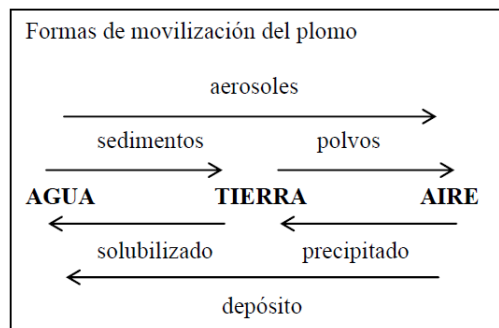


Fig. 1. Formas de movilización del plomo (Calderón y Maldonado, 2008)

El aire, el agua y la tierra no son los únicos medios por los que el plomo puede llegar al ser humano, existen otros medios como las plantas y animales, los cuales la mayoría de las veces son capaces de concentrar el plomo en sus órganos y secreciones, estos al ser consumidos por el humano, el contaminante llega en forma de alimento. De igual forma, las plantas y los animales al morir o a través de sus excretas vuelven a contaminar el ecosistema en la tierra, el aire o el agua, haciendo un círculo donde el

tóxico tiene eventualmente mayor biodisponibilidad; es decir, con mayor potencial de absorberse y dañar. Adicionalmente, los alimentos pueden ser contaminados con plomo directamente por el aire, la tierra y el agua contaminada, también por el almacenamiento, la preparación y la forma de consumir los alimentos (Calderón y Maldonado, 2008).

1.3 Toxicocinética y toxicodinamia del plomo

El plomo es probablemente uno de los metales pesados más estudiados. Diversos trabajos demuestran la presencia de mecanismos celulares, intracelulares y moleculares detrás de las manifestaciones toxicológicas causadas por plomo en el organismo (Flora *et al.*, 2012). A nivel molecular, la toxicidad por plomo involucra enlaces covalentes a proteínas, interacción con sitios estereoespecíficos de cationes divalentes como el Ca^{2+} , generación de metabolitos tóxicos y daño oxidativo (Aguilar-Dorado, 2014).

El plomo puede ingresar al organismo humano por tres vías (Fig. 2), aunque dos de ellas son las más importantes. El plomo puede ingresar al organismo por el alimento, el aire y el agua, a través de la boca y, si es deglutido, llegar al tracto digestivo. Por el aire, a partir de polvos, gases, aerosoles o neblinas, puede alcanzar vías respiratorias superiores y avanzar a las vías respiratorias inferiores, es decir el tracto respiratorio. Finalmente, el plomo en el agua, el aire, la tierra y en diversos materiales pueden tomar contacto con el organismo humano también a través de la piel (Gillis *et al.*, 2012; Calderón y Maldonado, 2008).

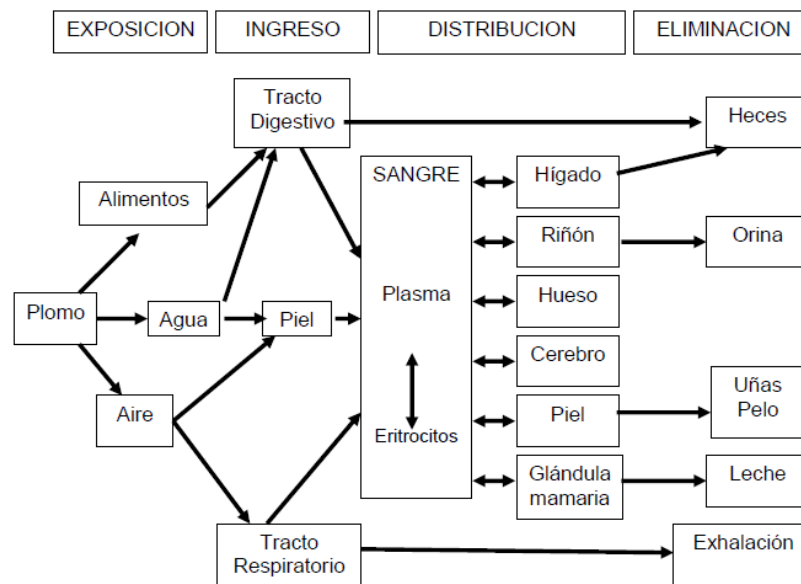


Fig. 2. Absorción, distribución, redistribución y eliminación del plomo en el organismo (Calderón y Maldonado, 2008).

La absorción del plomo depende de las características de solubilidad, de la aerodinámica, el tamaño y los efectos biológicos de las partículas, pero a su vez del gran volumen de aire contaminado que se respira y del tiempo que la persona permanezca en el ambiente contaminado con las partículas que contienen plomo. La mayor parte de plomo que llega a la sangre son sales divalentes, es decir con dos cargas positivas en disolución acuosa. Una menor proporción de plomo puede llegar a la sangre en forma de sales tetravalentes (sales orgánicas), las cuales, con las reacciones oxido-reductoras del organismo, son transformadas en sales divalentes solubles. Es por lo anterior que dentro del organismo siempre se refiere al plomo como un catión divalente y soluble en agua. El ejemplo más claro es que, para el ingreso por la piel se requiere un cierto grado de liposolubilidad, esta propiedad la adquiere cuando el plomo se presenta en sales orgánicas, tetraetilo o tetrametilo; por otro lado, puede ingresar por la piel en forma de sales inorgánicas (cloratos, nitratos, acetatos, entre otros) solamente si las mismas se combinan con elementos abrasivos y solventes orgánicos. El plomo ingresa por la vía digestiva a través del mismo sistema que el calcio, lo que condiciona una gran absorción. En otro caso, si existen sales de plomo en partículas respirables (0.5 a 1 micrómetros), pueden alojarse el tiempo suficiente en los alvéolos para poder permitir la absorción (Calderón y Maldonado, 2008).

El plomo a altas concentraciones se puede acumular en las membranas de célula con alta densidad de carga, como los eritrocitos (Aguilar-Dorado *et al.*, 2014), en estas células el plomo puede producir una reacción tipo Fenton, generando radicales libres (RL) e iniciando procesos de oxidación de lípidos en los ácidos grasos insaturados y poliinsaturados y extendiendo por reacciones en cadena de daño oxidativo (Flora *et al.*, 2012).

Sin embargo, la mayor proporción de daño oxidativo inducido por la exposición a plomo se puede explicar por los mecanismos indirectos. El plomo al reducir la actividad de varias enzimas (ácido delta aminolevulínico sintetasa, ácido delta aminolevulínico deshidratasa y ferroquelatasa) de la vía de síntesis del grupo hemo (molécula para la formación de hemoglobina y citocromos), genera un estado particular, donde se incrementan las concentraciones de hemo libre, hierro libre, ácido aminolevulínico (ALA) y protoporfirinas en el organismo, esto junto con la hemoglobina y el oxígeno, generan

condiciones de oxidación y autooxidación, con producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y generando en conjunto un insulto oxidativo; el cual, dependiendo de los mecanismos de defensa resultará en un mayor o menor daño oxidativo (Calderón y Maldonado, 2008). Las especies reactivas de oxígeno que se forman pueden ser el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}).

El plomo directa o indirectamente también puede modificar los mecanismos de defensa antioxidante disminuyendo tal respuesta de la primera línea de protección antioxidante, existe evidencia donde se inhibe la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD, encargada de reducir el radical libre superóxido $O_2^{\cdot-}$) y la catalasa (encargada de iniciar la transformación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a oxígeno y agua) (Rendón-Ramírez, 2014; Calderón y Maldonado, 2008).

1.3.1 Enzima ácido δ -aminolevulínico deshidratasa

La enzima ácido delta aminolevulínico deshidratasa (δ -ALAD, porfobilinógeno sintasa, 5-aminolevulinato hidrolasa, EC 4.2.1.24) cataliza la conversión de dos moléculas de ácido delta aminolevulinico a porfobilinógeno (PBG), el cual es un precursor inmediato de las porfirinas (Fujita *et al.*, 1981). La actividad de la enzima δ -ALAD en sangre, se disminuye cuando hay intoxicación con plomo (Fujita e Ishihara, 1988) (ver Fig. 3), con lo cual aumenta la concentración de ácido delta aminolevulinico en sangre o en orina (Calderón y Maldonado, 2008).

La δ -ALAD es una enzima clave en la producción de hemoglobina y otros componentes con esqueleto de porfirina, incluyendo citocromo y peroxidasa. Esta enzima está presente en cantidades apreciables en eritrocitos y también se ha detectado en una gran variedad de otros tejidos animales y vegetales. La δ -ALAD tiene grupos sulfidrilo y tioles necesarios para la actividad enzimática máxima y, debido a la alta afinidad entre los grupos SH y los iones metálicos, especialmente los metales pesados, puede esperarse que los metales puedan estar unidos a la enzima en su entorno natural. Varios autores describen el cobre como cofactor de δ -ALAD mientras que otros indican que el zinc está involucrado en su actividad (Krajnovit-Ozretik y Ozretit, 1980).

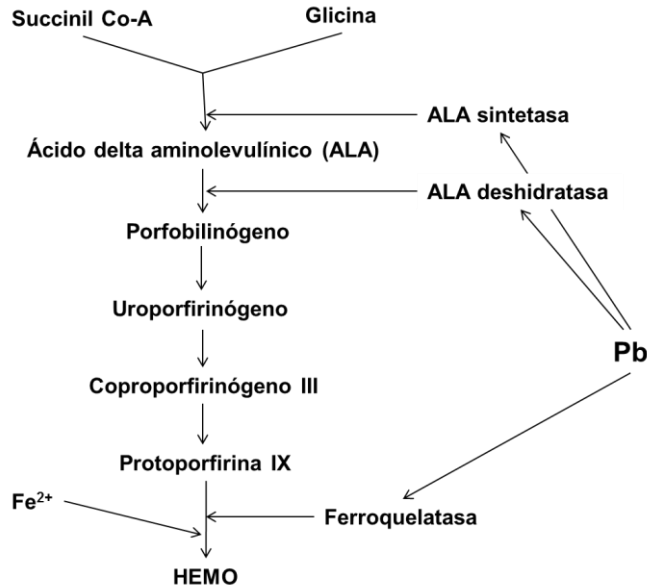


Fig. 3. Vía biosintética del grupo hemo simplificada. ALA sintetasa, ALA deshidratasa y ferroquelatasa son las tres enzimas inhibidas en mayor grado por plomo. Otras enzimas intermediarias como la uroporfirinógeno descarboxilasa y la coproporfirinógeno oxidasa pueden también ser afectadas. Figura tomada de Krajnovit-Ozretik y Ozretik, 1980.

1.3.2 Daño oxidativo

Los radicales libres (RL) son especies químicas que tienen un electrón desapareado en su orbital más externo, por lo que presentan alta reactividad. En los seres vivos, los RL provienen principalmente del oxígeno o del nitrógeno y pueden dañar lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, como lo esquematiza Flora y colaboradores en la figura 4 (2012). La formación de RL se lleva a cabo como resultado del metabolismo oxidativo en todos aquellos compartimentos subcelulares en donde existe un alto intercambio metabólico, como son las mitocondrias, el retículo endoplásmico liso y el citosol. Por otro lado, es conocido el hecho de que los RL derivados del oxígeno pueden formarse *in vitro* e *in vivo* por medio de reacciones espontáneas llamadas de Haber-Weis o tipo Fenton en donde interviene como catalizador un metal de transición, siendo el más importante el hierro. En los eritrocitos de todos los mamíferos existen reacciones tipo Fenton y Haber-Weis como consecuencia del intercambio gaseoso que ocurre cuando la oxihemoglobina pasa a ser metahemoglobina, en donde el hierro del grupo hemo de la hemoglobina reacciona en forma espontánea con el oxígeno (Guillis *et al.*, 2012). Las ROS así formadas reaccionan con las macromoléculas, principalmente los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana eritrocitaria, en donde

se lleva a cabo el fenómeno de la lipoperoxidación que da como metabolito final al malondialdehído (MDA), el cual se determina en el laboratorio como un índice de daño ocasionado por las especies de oxígeno reactivas ROS, que no necesariamente son RL (Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2009).

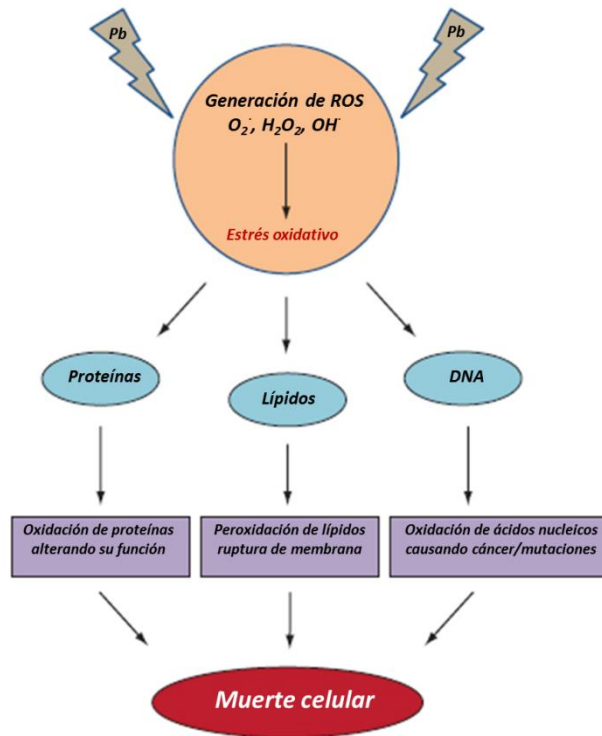


Fig. 4. Mecanismos y objetivos por los cuales se genera el estrés oxidativo, cuando existe exposición a plomo, modificada de Flora *et al.*, 2012.

1.4 Diagnóstico de intoxicación por plomo

1.4.1 Plomo en sangre

La prueba más frecuente y de mayor valor diagnóstico para la intoxicación con plomo es la determinación de plomo en sangre, la cual se puede realizar básicamente a través de tres técnicas; la espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, la espectrofotometría de plasma y la voltametría. Las tres tienen muy buena sensibilidad y reproducibilidad, pero la de voltametría es la técnica más rápida, de menor costo y con menos necesidad de procesar la muestra. Adicionalmente, la voltametría tiene la posibilidad de uso en campo con un aparato portátil, lo cual incrementa la posibilidad de atención en el momento de tener los resultados inmediatos e incluso poder realizar un

tamiz de la población y poder realizar otros estudios o análisis en el sitio donde se encuentra el paciente (Calderón y Maldonado, 2008). Además la técnica por voltametría se especifica en la Norma Oficial Mexicana NOM-199-SSA1-2000 como método para evaluar plomo en sangre en un intervalo de 1-100 mg/dL.

La Norma Oficial Mexicana NOM-047-SSA1-2011, establece que el Índice Biológico de Exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a plomo es de 30 $\mu\text{g/dL}$, dicho valor se propone para apoyar la evaluación del riesgo a la salud de personal que labora con plomo, y permite implementar y evaluar medidas de control dirigidas a la conservación de la salud y a la prevención de efectos nocivos en este personal. Por otro lado, para personal no ocupacionalmente expuesto, los valores de referencia según la Norma Oficial Mexicana NOM-199-SSA1-2000 para la concentración de plomo en sangre en niños, mujeres embarazadas y en periodo de lactancia es de 10 $\mu\text{g/dL}$ y para la concentración de plomo en sangre para el resto de la población expuesta no ocupacionalmente es de 25 $\mu\text{g/dL}$; la OMS y el Centro de Prevención y control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, indican que es de 5 $\mu\text{g/dL}$.

1.4.2 Pruebas de daño específicas

La actividad de la δ -ALAD es una prueba muy sensible y con buena especificidad para la intoxicación por plomo, esta prueba colorimétrica es fácil de realizar en cualquier laboratorio, es la prueba de elección para evaluar el daño inducido por el plomo (Santos *et al.*, 1998). Para su integración en el diagnóstico se tiene que considerar que al tener muy alta sensibilidad, es posible que en pacientes con concentraciones de plomo muy por arriba de 40 $\mu\text{g/dL}$ de sangre, no es posible relacionar la cantidad de plomo con la intensidad de daño evaluado a través de esta actividad. Es decir que una vez que se alcanza una notable reducción de la actividad, mayores niveles de plomo o más tiempo de exposición ya no pueden ser evaluados con la actividad de la enzima que permanece notablemente inhibida (Flora *et al.*, 2012). Las actividades normales de esta enzima se encuentran entre 500 y 1,000 nmolas/mL/h. Las intoxicaciones crónicas severas pueden llevar la actividad hasta 60 nmolas/mL/h (Calderón y Maldonado, 2008).

La concentración de protoporfirinas eritrocitarias libres y la concentración de ácido delta amino levulínico (ALA) en sangre y orina, pueden también usarse para determinar daño específico por plomo, son metabolitos acumulados por la inhibición de las enzimas

ferroquelatasa y la δ -ALAD, respectivamente. Sin embargo, no ofrecen ventajas sobre la determinación de la actividad de la δ -ALAD (Guillis *et al.*, 2012; Calderón y Maldonado, 2008).

1.4.3 Pruebas de daño no específicas

Para la evaluación del daño oxidativo, se realiza una prueba sencilla y recomendada para la determinación de la concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) en sangre, una determinación sencilla y económica que evalúa la peroxidación de lípidos, así que permite conocer la intensidad de daño en un paciente al que se ha diagnosticado con plomo (Calderón y Maldonado, 2008). El MDA es un producto final de la peroxidación lipídica y tiene efecto sobre la viscosidad de los eritrocitos. La acumulación de MDA en los eritrocitos es evaluada por la reactividad del ácido tiobarbitúrico (TBA), es decir, el MDA puede reaccionar con el TBA y formar un compuesto colorido el cual se puede determinar por espectrofotometría (Jain *et al.*, 1989 y 1990).

El daño peroxidativo en la célula puede evitarse por mecanismos de defensa, incluyendo sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. El plomo puede reducir las actividades de enzimas como catalasa y SOD, enzimas antioxidantes que descomponen radicales libres como el hidroxilo y superóxido, y otras ROS en el eritrocito, de la misma manera el plomo es capaz de inducir daño oxidativo a altas concentraciones, por lo tanto, la intoxicación por plomo podría incrementar especies reactivas de oxígeno lo cual induce un proceso oxidativo y daño a las proteínas del eritrocito (Rendón-Ramírez *et al.*, 2007).

La reducción en la velocidad y la coordinación neuromotora, se pueden determinar cualitativamente con una prueba clínica de coordinación motora (dedo-dedo y dedo-nariz), sin embargo, son pruebas subjetivas y requiere mucha experiencia médica. Otra prueba como el punteado basófilo de eritrocitos mediante tinción con hematoxilina y eosina visto al microscopio, estos puntos azules aparecen solo en ciertos pacientes con alta concentración de plomo y tiempos prolongados de exposición. En radiografías de pacientes con altas concentraciones de plomo y tiempos prolongados de exposición se puede llegar a observar una línea electrodensa en la diáfisis de huesos largos. Pruebas que pueden demostrar procesos patológicos y una asociación con el diagnóstico de la

exposición, se encuentran las pruebas de funcionamiento hepático, función renal, irritación cerebral, electroencefalogramas, biometrías hemáticas (anemia normocítica y normocrómica) y el incremento de la presión arterial, no obstante, estas deben ir acompañadas de las pruebas específicas que indiquen daño por plomo, mencionadas en apartados anteriores (Stoleski *et al.*, 2008; Calderón y Maldonado, 2008).

1.5 Síntomas clínicos de intoxicación por plomo

Los efectos del plomo varían según el grado de exposición y la susceptibilidad de las personas, en general perjudica la habilidad cognitiva, el crecimiento, la audición, además que daña principalmente a los sistemas hematopoyético, hepático, renal, reproductivo y gastrointestinal (Calderón y Maldonado, 2008). El envenenamiento se manifiesta en un cuadro sintomático determinado en los adultos por cólicos, anemia, dolor de cabeza, fatiga, neuropatía periférica, parestias y parestesias. Los niños como el grupo con mayor susceptibilidad muestran principalmente deficiencia en el desarrollo psicomotor, intelectual y de aprendizaje, y en los casos de intoxicación aguda se presentan vómitos, anorexia, convulsiones, coma y encefalopatía, esto además de las manifestaciones moleculares mencionadas previamente (NOM-199-SSA1-2000).

En adultos se afectan las articulaciones y músculos produciendo debilidad y dolor de dedos, manos y tobillos. Puede causar anemia, aumento de la presión arterial, dolor abdominal, estupor y crisis convulsivas dependiendo de los niveles de plomo y el tiempo de evolución de la intoxicación. Puede también afectar el sistema reproductivo masculino (NOM-004-SSA1-2013). Los síntomas de intoxicación por plomo varían de acuerdo con la exposición como los han reportado Flora y colaboradores (2012) como se muestra en la tabla 2.

| Tabla 2. Tipos de contaminación por plomo y sus efectos (Flora <i>et al.</i> , 2012) | | | |
|---|--|--------------------------------|---|
| | <i>Exposición</i> | <i>Nivel de Pb (µg/dL)</i> | <i>Síntomas clínicos</i> |
| Contaminación aguda | Exposición intensa y de corta duración | 100-120 | Dolor muscular, dolor abdominal, dolor de cabeza, fatiga, vómitos, convulsiones y coma. |
| Contaminación crónica | Exposición repetida a niveles bajos durante un tiempo prolongado | 40-60 | Vómitos persistentes, encefalopatía, letargia, delirio, convulsiones y coma. |

La evolución de la intoxicación crónica con plomo se indica en la Tabla 3, se presenta una aproximación temporal de la evolución de un paciente expuesto ocupacionalmente a plomo de manera continua (Calderón y Maldonado, 2008).

| Tabla 3. Evolución de la intoxicación crónica por plomo y aproximación temporal ante exposición ocupacional continua (Calderón y Maldonado, 2008) | | |
|--|--|---------------|
| <i>Fase</i> | <i>Condición</i> | <i>Tiempo</i> |
| I | Ambiente sin contaminación | Días a años |
| II | Ambiente con Pb | Días a años |
| III | Contacto con Pb | Días a 1 mes |
| IV | Exposición a Pb | 2 meses |
| V | Absorción a Pb | 3 meses |
| VI | Distribución y redistribución de Pb | 4 meses |
| VII | Daño molecular y celular | 6 meses |
| VIII | Manifestaciones subclínicas | 2 años |
| IX | Manifestaciones clínicas | 3 años |
| X | Daño renal irreversible, coma y muerte | 20 años |

2. Antecedentes

Trabajos previos en nuestro laboratorio, han permitido caracterizar poblaciones de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo, se han definido mecanismos fisiopatológicos de daño y mecanismos de respuesta a este metal tóxico (Rendón-Ramírez, 2014; Aguilar-Dorado *et al*, 2014).

En eritrocitos humanos se ha demostrado que el plomo se acumula en el interior de estas células por su gran afinidad a proteínas. Este metal es capaz de incorporar calcio porque comparte el mismo sistema de transporte tanto de entrada como de salida (Calderón-Salinas *et al.*, 1999). Se ha postulado que los canales catiónicos no selectivos permeables a Ca^{2+} , son activados por estrés oxidativo con la subsecuente entrada de Ca^{2+} , lo que induce eriptosis, un proceso de apoptosis presente en los eritrocitos (Hermle *et al.*, 2006; Quintanar *et al.*, 2007).

2.1 Eritrocitos

Los glóbulos rojos o eritrocitos son células en forma de discos bicóncavos de un diámetro de 7-8 μm , tienen una membrana resistente y flexible que les permite deformarse sin que se rompan mientras se comprimen en el recorrido por los capilares estrechos. Los eritrocitos carecen de núcleo u otros organelos, no pueden reproducirse ni llevar a cabo actividades metabólicas complejas, su citosol contiene la proteína transportadora de oxígeno, la hemoglobina, estas moléculas de hemoglobina son sintetizadas antes de la pérdida del núcleo y constituyen alrededor del 33% del peso de estas células.

Cada eritrocito contiene alrededor de 280 millones de moléculas de hemoglobina, una molécula de estas consiste en una proteína globina, compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas (dos alfa y dos beta); un pigmento no proteico de estructura anular llamado hemo está unido a cada una de las cuatro cadenas. En el centro del anillo hay un ion hierro (Fe^{2+}) que puede combinarse reversiblemente con una molécula de oxígeno, permitiéndole a cada hemoglobina unirse con cuatro moléculas de oxígeno; la reacción hierro-oxígeno se revierte mientras la sangre fluye por los capilares tisulares.

Un hombre adulto sano tiene alrededor de 5.4 millones de eritrocitos por microlitro de sangre y una mujer adulta alrededor de 4.8 millones, para mantener el número normal de ellos, deben entrar a la circulación nuevas células maduras con la asombrosa

velocidad de por lo menos 2 millones por segundo, un ritmo que equipara a la destrucción, también rápida, de eritrocitos. El tiempo de vida media de los eritrocitos es de 120 días por el desgaste que sufren sus membranas plasmáticas al deformarse en los capilares sanguíneos, son retirados por los macrófagos fijos del bazo e hígado en el sistema reticuloendotelial (Tortora y Derrickson, 2006).

2.1.1 Eriptosis

La apoptosis también llamada muerte celular programada, es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada; este fenómeno implica una programación celular, genéticamente regulada, para que la célula muera sin causar daño en la organización de los tejidos a que pertenece; es decir que la célula muere sin causar una reacción inmunológica o inflamatoria que afecte a las células vecinas y con ello mantener la integridad del tejido. Hasta el año 2001, se pensaba que la apoptosis era un fenómeno de células nucleadas y que no podía encontrarse en células sin núcleo, como los eritrocitos, los trabajos de Berg y Bratosin indicaron que la apoptosis se podía presentar en células sin núcleo, la eriptosis (Quintanar y Calderón, 2006).

La eriptosis es iniciada por una compleja señalización incluyendo el incremento de la concentración de calcio intracelular libre ($[Ca^{2+}]_i$), ceramida, prostanglandina E_2 (PGE_2) (Fig. 5), activación de caspasas, cinasas, canales iónicos y translocación de fosfatidilserina (Fig. 6) en la monocapa externa de la membrana, lo cual es una señal de reconocimiento por los macrófagos (Aguilar-Dorado *et al.*, 2014).

Tabla 4. Concentración de plomo en sangre, actividad de δ -ALA-D, lipóperoxidación, $[Ca^{2+}]_i$ libre y concentración de PGE₂ en eritrocitos de pacientes no expuestos y expuestos a plomo.

| Parámetros de intoxicación por plomo | No expuestos a plomo (n = 15) | Expuestos a plomo (n = 15) |
|--------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| [Plomo en sangre] (µg/dl) | 4.7 ± 1.0 | 68 ± 4.6* |
| TBARS (nmol MDA/ml) | 0.55 ± 0.15 | 0.99 ± 0.28* |
| ALA D (nmol/h/ml) | 736 ± 167 | 254 ± 74* |
| $[Ca^{2+}]_i$ (nM) | 73.1 ± 5.6 | 101 ± 20* |
| PGE ₂ | 0.33 ± 0.16* | 0.99 ± 0.18 |

Se muestran los valores promedio ± SD.*P<0.0001, según t-Student.

Fig. 5. Tabla de parámetros de intoxicación por plomo y mecanismos de eriptosis en trabajadores no expuestos y expuestos a plomo, tomada de Aguilar-Dorado 2014, Tesis de Doctorado.

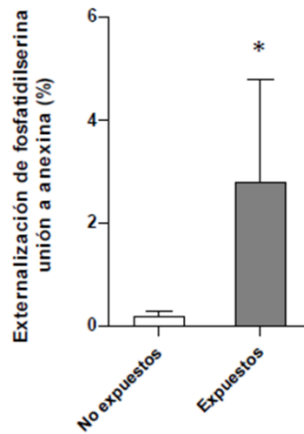


Figura 10. Unión a Anexina-V-FITC en eritrocitos de la población no expuesta (n = 40) y expuesta (n = 40), se muestra el promedio y la desviación estándar. *p < 0.005, según la prueba t-Student.

Fig. 6. Indicador de eriptosis a través de la medición de externalización de fosfatidilserina en trabajadores expuestos a plomo, tomada de Aguilar-Dorado 2014, Tesis de Doctorado.

2.1.1.1 Mecanismos moleculares involucrados en la eriptosis

Los principales mecanismos que están involucrados en el inicio de la eriptosis son la disminución de la carga energética de la célula (relación ATP/ADP), la disminución del poder reductor (la relación de NADH+H⁺/NAD⁺) y el estrés osmótico. Estas tres formas de estrés metabólico que pueden inducir eriptosis (energético, oxidativo y osmótico) producen un incremento de calcio intracelular libre, inclusive cuando se lleve a cabo por diferentes vías. En el caso del estrés energético la reducción de la concentración de ATP

afecta a la ATPasa de calcio, reduciendo su actividad y con ello la salida de calcio y el consecuente incremento de calcio intracelular. Para el caso del estrés oxidativo, la disminución del glutatión reducido incrementa la permeabilidad a calcio a través del canal de cationes, permitiendo una mayor entrada de calcio y con ello el incremento de este catión en el interior del eritrocito. Por su parte el estrés osmótico, activa a la fosfolipasa A₂, que libera ácido araquidónico de la fosfatidilcolina, dicho ácido es convertido por la enzima ciclooxigenasa a prostanglandina E₂, la cual estimula al canal catiónico del que depende la entrada de calcio. El incremento de calcio intracelular libre activa el canal Gardós (canal de potasio dependiente de calcio), que provoca salida de potasio, agua y cloruro, generando una contracción del eritrocito. Estos procesos activan a una escramblasa de fosfatidilserina lo que provoca su externalización a la monocapa externa de la membrana (Fig. 7).

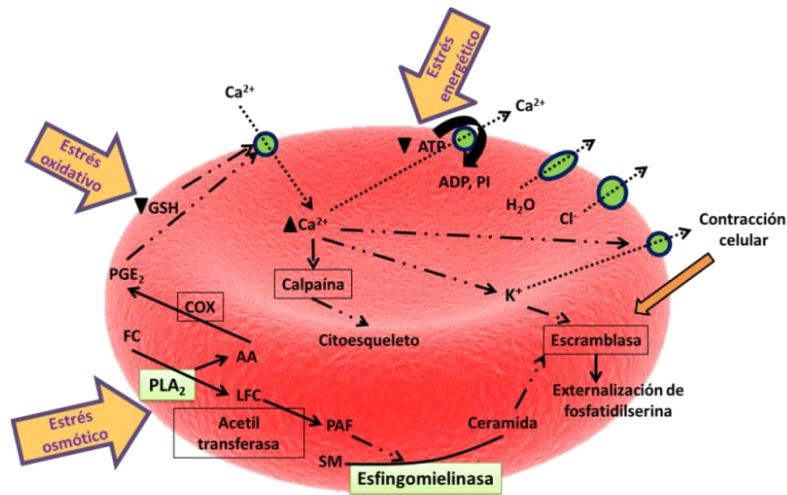


Fig. 7. Mecanismos moleculares del proceso apoptótico en eritrocitos. Esquema de un eritrocito en apoptosis. Fosfolipasa A₂ (PLA₂), ácido araquidónico (AA), fosfatidilcolina (FC), lisofosfatidilcolina (LFC), factor de activación plaquetario (PAF), esfingomielina (SM), glutatión reducido (GSH). Las líneas indican (— sustrato a metabolito); (- - - transporte); (- - - efecto regulatorio), ▲ indica un incremento, ▼ indica una disminución, modificado de (Quintanar y Calderón, 2006).

Por otro lado, la acción de la fosfolipasa A₂, no solo genera ácido araquidónico, también genera un lisoderivado, el cual es transformado por una acetiltransferasa en el factor activador de plaquetas (PAF), dicho factor está involucrado en la regulación de procesos inflamatorios, trombosis y efectos cardiovasculares. El PAF estimula a la esfingomielinasa, enzima que hidroliza esfingomielina para generar ceramida, la cual

actúa como un segundo mensajero para la señal de apoptosis en células nucleadas y que en este caso es capaz de estimular a la escramblasa de fosfatidilserina y con ello contribuir a la externalización del fosfolípido.

La μ -calpaína, una proteasa de cisteína, es una enzima involucrada en la eritosis y en las células nucleadas también es una señal pro-apoptótica. Esta proteasa es activada por el incremento de calcio intracelular libre y, al sufrir autoproteólisis degrada proteínas del citoesqueleto como la espectrina y la fodrina, desestabilizando la membrana e induciendo la formación de microvesículas características de la apoptosis (Quintanar y Calderón, 2006).

Lang y colaboradores (2005), demostraron que la fosfolipasa A₂ es activada por estrés osmótico y Aguilar-Dorado (2014) comprobó que la intoxicación por plomo provoca estrés osmótico, pues estimula el aumento de la entrada de calcio al eritrocito y reduce la salida de calcio. Debido a ello, el plomo también genera estrés energético al reducir la actividad de la ATPasa de calcio. Sin embargo, Villanueva-Ibarra (2018) en su tesis de maestría demostró un incremento en las actividades de fosfolipasa A₂ y esfingomielinasa de eritrocitos, asociado a la intoxicación por plomo como puede verse en la figura 8.

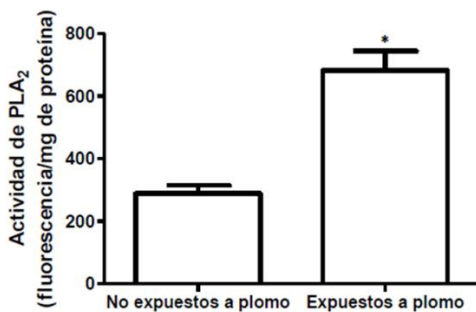


Figura 12. Actividad de fosfolipasa A₂ en eritrocitos, determinada por la fluorescencia del reactivo Red/Green BODIPY PC-A₂, en grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo. Se presenta media y desviación estándar. * diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

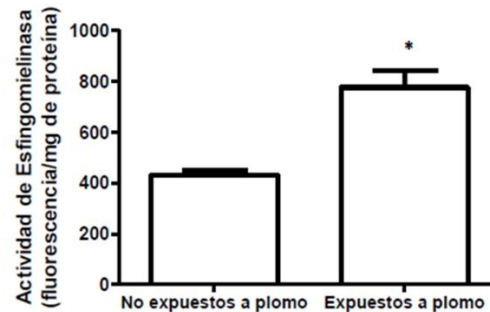


Figura 13. Actividad de esfingomielinasa en eritrocitos, determinada por la fluorescencia del reactivo Amplex red, en grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo. Se presenta media y desviación estándar. *diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

Fig. 8. Efecto de la intoxicación por plomo en la actividad de las enzimas fosfolipasa A₂ y esfingomielinasa de eritrocitos de trabajadores expuestos. Tomadas de Villanueva-Ibarra, 2008, Tesis de Maestría.

Los síntomas y signos clínicos asociados con la intoxicación crónica con plomo como mareos, cefalea, parestesia, paresia, cólicos abdominales, mialgia y alteración de la coordinación motora se han encontrado con frecuencia en los trabajadores expuestos al plomo, dicha sintomatología está asociada a procesos pro-inflamatorios (Levin y

Goldberg, 2000). El porcentaje de un grupo de trabajadores expuestos con estos síntomas se ha reportado significativamente mayor que en un grupo control (Fig. 9) (Rendón-Ramírez *et al.*, 2014).

| Table 1 – Number of individuals presenting clinical symptoms and signs associated to lead intoxication in lead and non-lead exposed workers. | | | |
|---|------------------------------|--------------------------|--|
| | Non-lead exposed (n = 19) | Lead exposed (n = 15) | % in lead exposed (95% confidence interval) |
| Dizziness | 1 | 7* | 46.6 (21–73) |
| Headache | 3 | 11* | 73.3 (45–92) |
| Paresthesia | 1 | 6* | 40.0 (16–68) |
| Paresis | 0 | 3* | 20.0 (4–48) |
| Abdominal colic | 2 | 5* | 33.3 (12–62) |
| Myalgia | 2 | 8* | 53.3 (27–79) |
| Motor coordination alteration | 1 | 14* | 93.3 (68–100) |

* Significant difference ($P \leq 0.05$) between lead and non-lead exposed workers, according to X^2 test. In the third column, percent (lower 95% CI – upper 95% CI) of individuals with a sign or symptom in the lead-exposed group, assuming binomial distribution, 'exact method', computed following (Blair and Taylor, 2008).

Fig. 9. Tabla donde se presenta el porcentaje de trabajadores no expuestos y expuestos a plomo que presentan sintomatología propia de la intoxicación por plomo, tomada de Rendón-Ramírez *et al.*, 2014.

2.2 La inflamación

La inflamación es una respuesta defensiva, inespecífica del organismo ante una lesión tisular o a un estímulo nocivo. Entre las causas que pueden producir inflamación podemos mencionar: infecciones, abrasiones, irritación química, fármacos, tóxicos, radiaciones y temperaturas extremas. Los cuatro signos y síntomas que caracterizan al proceso inflamatorio son: rubor, dolor, calor y tumefacción (edema o hinchazón). La inflamación puede también producir la pérdida de la función del área afectada, por ejemplo, la pérdida de la sensibilidad, dependiendo del sitio y de la extensión de la lesión. La inflamación es un intento de eliminar a los microorganismos, toxinas o sustancias extrañas presentes en el sitio de la lesión, impedir la diseminación hacia otros tejidos y preparar al sitio de lesión para el proceso de reparación tisular en un intento de restaurar la homeostasis del tejido afectado, en el caso de pertinencia crónica de daño, el proceso inflamatorio puede tener diversos caminos, que pueden generar resistencia. Las células principalmente involucradas en el proceso inflamatorio son los leucocitos (Tortora y Derrickson, 2006).

2.2.1 Leucocitos

Los leucocitos se clasifican como granulares o agranulares, dependiendo de si tienen gránulos citoplasmáticos notables (vesículas) visibles por técnicas de tinción. Los granulocitos incluyen a los neutrófilos, eosinófilos y basófilos, los leucocitos agranulares incluyen a los linfocitos y monocitos. En la tabla 4 se resumen las características y funciones de los leucocitos que se encuentran en la sangre. Los leucocitos son mucho menos numerosos que los eritrocitos; con solamente 5,000 a 10,000 células por microlitro de sangre, son superados por los segundos en una relación 700:1. La mayoría de estas células viven algunas horas o incluso pocos días, algunos pueden vivir por muchos años una vez que se han activado por ejemplo los linfocitos B y los T. Su función en general es combatir patógenos y sustancias exógenas que entran al organismo.

| Tabla 4. Características y funciones de los leucocitos de la sangre (Tortora y Derrickson, 2006) | | | |
|---|----------------|---|--|
| <i>Leucocitos</i> | <i>Número*</i> | <i>Características**</i> | <i>Funciones</i> |
| Granulocitos | | | |
| • Neutrófilos | 60-70% | Diámetro: 10-12 μm ; núcleo tiene 2-5 lóbulos conectados por finas hebras de cromatina; citoplasma con pequeños gránulos finos lila-pálidos. | Fagocitosis. Destrucción de bacterias por medio de lisozima, defensinas y fuertes agentes oxidantes. |
| • Eosinófilos | 2-4% | Diámetro: 10-12 μm ; núcleo con 2 lóbulos conectados por una gruesa hebra de cromatina; citoplasma con grandes gránulos anaranjado-rojizos. | Combaten los efectos de la histamina en reacciones alérgicas, fagocita complejos antígeno-anticuerpo, destruyen ciertos parásitos. |
| • Basófilos | 0.5-1% | Diámetro: 8-10 μm ; núcleo con 2 lóbulos; citoplasma con grandes gránulos azul-violáceo. | Liberan heparina, histamina y serotonina en reacciones alérgicas que intensifican la respuesta inflamatoria global. |
| Agranulocitos | | | |
| • Linfocitos (Células B, T y NK) | 20-25% | Pequeños son de 7-9 μm de diámetro y los grandes de 10-14 μm ; núcleo redondeado o levemente hendido; citoplasma | Median respuestas inmunitarias. Las células B se desarrollan en células plasmáticas. Las células T |

| | | | |
|---|------|--|--|
| | | celeste-azulado que forma un halo alrededor del núcleo. | atacan virus, células cancerosas. Las NK atacan agentes infecciosos y ciertas células tumorales. |
| • Monocitos | 3-8% | Diámetro: 12-20 µm; núcleo con forma de riñón o herradura; citoplasma azul-grisáceo y posee apariencia espumosa. | Fagocitosis (tras transformarse en macrófagos fijos o circulantes) |
| * Del total de leucocitos ** De acuerdo con la tinción de Wright | | | |

La inflamación aguda es la respuesta temprana (casi inmediata) a la lesión. La reacción local de la lesión se conoce por sus signos cardinales; rubor (enrojecimiento), tumor (tumefacción), calor, dolor y pérdida de la función. Además, en este tipo de inflamación se incluyen dos componentes principales: la etapa vascular y la etapa celular. A nivel bioquímico los mediadores inflamatorios, que actúan juntos o en secuencia, amplifican la respuesta inicial e influyen en la evolución mediante la regulación de las respuestas vasculares y celular posteriores. La etapa celular específicamente se caracteriza por la movilización de leucocitos hacia el área de la lesión. En la respuesta inflamatoria aguda participan dos tipos de leucocitos: granulocitos, fagocitos mononucleares (monocitos) y mastocitos. Cabe destacar que los monocitos son los glóbulos blancos de mayor tamaño, la vida media de los monocitos circulantes dura de tres a cuatro veces más que la de los granulocitos y además, sobreviven durante un tiempo más prolongado en los tejidos; estos fagocitos de larga vida ayudan a destruir al agente causal, contribuyen al proceso de señalización de la inmunidad específica y sirven para resolver el proceso inflamatorio; los monocitos que migran en cantidades aumentadas a los tejidos en respuesta a los estímulos inflamatorios maduran hasta convertirse en macrófagos (Porth, 2006).

2.2.2 Mediadores inflamatorios

Lo que desencadena la inflamación ante la lesión, sus signos y síntomas son los mediadores químicos. Estos mediadores pueden ser clasificados de acuerdo con su función en:

- 1) Los que poseen propiedades vasoactivas y causan contracción del músculo liso como la histamina, las prostanglandinas, los leucotrienos y el factor activador de plaquetas (PAF)
- 2) Factores quimiotácticos como los fragmentos del complemento y las citocinas
- 3) Proteasas plasmáticas que pueden activar el complemento y los componentes del sistema de coagulación
- 4) Moléculas y citocinas reactivas liberadas por los leucocitos que cuando son secretadas en el ambiente extracelular pueden dañar el tejido circundante (Porth, 2006).

2.2.2.1 Metabolitos del ácido araquidónico

El ácido araquidónico (ácido graso no saturado de 20 carbonos) está presente en los fosfolípidos de las membranas celulares, la liberación de este por las fosfolipasas desencadena una serie de reacciones complejas que conducen a la producción de prostanglandinas, leucotrienos y otros mediadores de la inflamación. La síntesis de mediadores inflamatorios sigue una de dos vías: 1) La vía de la ciclooxigenasa, que culmina en la síntesis de prostanglandinas, 2) la vía de la lipoxigenasa, que culmina en la síntesis de leucotrienos.

A partir del ácido araquidónico se sintetizan varias prostanglandinas, las estables (PGE₁ y PGE₂) inducen la inflamación y potencian los efectos de la histamina y otros mediadores inflamatorios. La aspirina y los AINES reducen la inflamación mediante la inactivación de la primera enzima de la vía ciclooxigenasa para la síntesis de la prostanglandina (Porth, 2006).

2.2.2.2 Citocinas

Las citocinas son polipéptidos que se producen en muchos tipos celulares (sobre todo en linfocitos y macrófagos), las cuales modulan la función de otros tipos de células. Las interleucinas (IL), los interferones (IFN) y el factor de necrosis tumoral (TNF) son las citocinas que participan en la respuesta inflamatoria (Porth, 2006).

2.2.3 Factor de necrosis tumoral alfa

Varias citocinas desempeñan funciones esenciales en la coordinación del proceso inflamatorio, sobre todo el factor de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*) y la interleucina-1 (IL-1). Son secretadas por monocitos, macrófagos, adipocitos y otras células. Su acción en coordinación entre sí y con diversas citocinas y factores de

crecimiento (tales como IL-6, IL-8 y factor estimulador de la colonia del granulocito y el macrófago), activan la expresión génica y la síntesis de proteína (lo que comprende la expresión de COX-2, moléculas de adhesión y proteínas de fase aguda) en diversas células para mediar y favorecer la inflamación (Corti *et al.*, 1994; Perdomo-Celis *et al.*, 2016).

El TNF consta de dos proteínas relacionadas muy de cerca: TNF maduro (TNF- α) y linfotóxina (TNF- β), las cuales son reconocidas por los receptores de TNF, un receptor de tipo 1 de 75 kDa y un receptor de tipo 2 de 55 kDa (Dempsey *et al.*, 2003). El TNF- α es una potente citocina pro-inflamatoria ejerciendo efectos pleiotrópicos en varios tipos celulares y también tiene una función crítica en la artritis reumatoide, psoriasis, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn y en las infecciones (Horiuchi *et al.*, 2010).

El TNF- α es generado como un precursor llamado TNF- α transmembrana que se expresa como un polipéptido de superficie celular que consta de 233 residuos de aminoácidos (26 kDa) en macrófagos y linfocitos activados, así como otros tipos de células. Este TNF- α transmembrana, es procesado por una metaloproteinasa, la enzima convertidora de TNF- α (TACE) entre los residuos alanina 76 y valina 77, entonces se libera la forma soluble de TNF- α de 157 residuos de aminoácidos (un homotrímero de 17 kDa), una vez soluble en el plasma, ejerce su actividad biológica a través de los receptores de TNF tipos 1 y 2 (TNF-R1 también conocidos como TNFRSF1A, CD120a y TNF-R2 también conocidos como TNFRSF1B, CD120b, respectivamente) (Horiuchi *et al.*, 2010). El TNF- α es liberado por las células y sobre todo en los leucocitos (monocitos/macrófagos) cuando es estimulado por lipopolisacárido (LPS), este último es un componente de la membrana externa de bacterias gram-negativas, capaz de inducir choque séptico, por alterar la circulación sistémica, y es un potente inductor de TNF- α *in vivo* e *in vitro* (Cheng *et al.*, 2006).

Trabajos previos han reportado la asociación de TNF- α así como otras citocinas, en la exposición a plomo *in vivo* e *in vitro*, como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Referencias bibliográficas que reportan la asociación de TNF- α con modelo celular y en personas expuestas a plomo.

| Referencia | Análisis | Modelo |
|---|--|--|
| Villanueva, <i>et. al.</i> (2000) | IL-6*, TNF- α * (hasta 1.5 veces). | Cultivo de células mononucleares de sangre periférica incubadas <i>in vitro</i> con plomo (50 y 100 μ M) |
| Di Lorenzo, <i>et. al.</i> (2007) | G-CSF*, TNF- α | Suero de trabajadores de recicladora de Pb (30.7 μ g/dL) |
| Valentino, <i>et. al.</i> (2007) | IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10*, TNF- α * (0.5 veces). | Plasma de trabajadores expuestos (Cerámica y fundidora: 9.7 y 21.7 μ g/dL de Pb) |
| * Reportan diferencia estadística respecto al grupo control y/o no expuesto | | |

3. Justificación

La exposición a plomo en trabajadores, las medidas de seguridad deficientes, los procesos industriales poco controlados y altamente contaminantes presenta un problema de salud laboral que debe ser atendido y entendido a nivel clínico y molecular.

Existen reportes de que la exposición a plomo aumenta la producción de citocinas que son capaces de inducir una respuesta pro-inflamatoria, como el TNF- α , el cual se ha analizado *in vitro*, en cultivos celulares expuestos a plomo de leucocitos y macrófagos, pero no se ha estudiado acerca de esta citocina *in vivo* desde una manera integral, con una perspectiva toxicológica, pro-inflamatoria, molecular (daño oxidativo y apoptosis) y clínica.

El estado pro-inflamatorio implica a los leucocitos de trabajadores expuestos a plomo lo cual no ha sido estudiado desde la perspectiva de la apoptosis, la producción de TNF- α , y la estimulación de la liberación de esta citocina.

El estudio de estos pacientes permitirá profundizar en la pato-fisiología de la intoxicación por plomo y conocer más de los mecanismos pro-inflamatorios y oxidativos involucrados en el daño que se induce por la exposición a este metal, que podrá dar plataformas de información para la toma de decisión en el caso del tratamientos primario y secundario de los trabajadores.

4. Hipótesis

La intoxicación por plomo produce un estado clínico y molecular pro-inflamatorio, con un incremento en la producción y liberación de TNF- α por leucocitos de pacientes expuestos a plomo, que se encuentra asociado con daño oxidativo y apoptosis.

5. Objetivo general

Estudiar si existe un estado clínico y molecular pro-inflamatorio a partir de la producción y liberación de TNF- α por leucocitos en sangre de trabajadores expuestos a plomo y su relación con el proceso oxidativo y el apoptótico.

5.1 Objetivos específicos

- Determinar el tipo y grado de exposición e intoxicación por plomo en trabajadores de una fábrica de reciclaje de baterías, a partir de la concentración de plomo y la actividad de la enzima δ -ALAD en sangre total.
- Generar un grupo comparativo de trabajadores no expuestos ocupacionalmente a plomo con respecto a la concentración de plomo y la actividad de la enzima δ -ALAD en sangre total.
- Determinar la lipoperoxidación de eritrocitos en trabajadores expuestos y no expuestos, como marcador de daño oxidativo.
- Evaluar la externalización de fosfatidilserina en eritrocitos y en leucocitos de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo, como parámetro de apoptosis.
- Estudiar el tipo y grado de exposición e intoxicación por plomo en trabajadores expuestos y no expuestos en base a la historia clínica con énfasis toxicológico y el estado pro-inflamatorio.
- Evaluar el estado pro-inflamatorio en trabajadores expuestos y no expuestos a plomo, a partir de la concentración de TNF- α en plasma.
- Evaluar la capacidad potencial de producción y liberación de TNF- α , en sangre total de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo.

6. Materiales y métodos

Se realizó una evaluación general de salud con énfasis en aspectos toxicológicos propios del ambiente, especialmente intoxicación por plomo en trabajadores de una fábrica de reciclaje de baterías, ubicada en la Ciudad de León, Guanajuato y en la población de Ojo de Agua de Ballesteros, Salvatierra, Guanajuato; la cual estuvo a cargo del Dr. José Víctor Calderón Salinas y la Dra. María Maldonado Vega.

Los estudios en población abierta se plantean desde el punto de vista clínico, de gabinete, bioquímico, y toxicológico. Para poder llevar a cabo los estudios de acuerdo a las normas nacionales e internacionales, se realizaron solicitudes formales, viajes para dialogar con los comités estatales y municipales encargados de la salud para generar acuerdos y alinear los objetivos comunes que permitieran las autorizaciones correspondientes. Asimismo, se realizaron reuniones con los colonos de la comunidad de Ojo de Agua de Ballesteros y también con los dueños de la recicladora para comunicar objetivos generales del estudio y generar grupos de apoyo local para la consecución del mismo. De igual manera, se realizaron reuniones de trabajo con autoridades para los registros oficiales del proyecto de investigación y de ética correspondientes y lograr los apoyos necesarios en caso de que algunos pacientes requieran atención médica en el hospital de tercer nivel. De lo anterior, se lograron las siguientes aprobaciones y registros:

1. Aprobación del proyecto, así como el cumplimiento de las normas bioéticas por parte del Consejo de Bioética de Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío: CNBMX-CEB-32-2011-100
2. Aprobación del proyecto por parte del Comité de Investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío quedando el registro de aprobación del proyecto con el número CI-HRAEB-2015-07
3. Registro del proyecto y aprobación del Comité de Ética en Investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío con registro de autorización del comité: CNBCEI-11-0001-2009.05.01 y quedando como registros de aprobación del Proyecto el número CEI-31-15

Una vez avanzada esta etapa, se trabajó en visitas conjuntas para la coordinación con las autoridades correspondientes de las poblaciones ya nombradas, se programaron

las reuniones para la planeación así como la convocatoria con la población participante para el estudio. Se apoyó en la entrega de las convocatorias, citas, encuestas y consentimientos informados.

6.1 Elección del tamaño de muestra

El tamaño de muestra se eligió sabiendo que en la población estudiada no expuesta es posible que algunos individuos estén intoxicados con plomo, esto se refiere a que en la población puede haber un pequeño porcentaje de intoxicados para fines estadísticos, es considerado en un 1% o 2%, que consideraríamos como una población “normal”.

Lo que se pretendió entonces fue determinar un tamaño de muestra que tuviera la potencia suficiente para discernir entre el porcentaje de población “normal” y otro que sea preocupante, es decir, que estén muy intoxicados, lo que llamaríamos un porcentaje crítico, que puede ser por ejemplo 5%, 7%, 10% o 15%, que consideraríamos como una población “intoxicada”.

Para estas posibilidades puede calcularse una potencia de prueba del 80% que es la estándar o bien del 90% que sería la ideal. Así que calculando para una potencia de prueba del 90% con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ que es la usual, teniendo en cuenta que para valores normales de 1% y 2% y valores críticos de 5%, 7%, 10% o 15%, obtendríamos que:

| | 5% | 7% | 10% | 15% |
|----|-----|-----|-----|-----|
| 1% | 144 | 79 | 49 | 30 |
| 2% | 330 | 144 | 70 | 38 |

Así entonces se observa que a mayor distancia entre los valores (porcentajes) “normal” y “crítico”, menor es el tamaño de muestra que se necesita. La potencia nos determina la probabilidad de observar una diferencia entre la población normal y la intoxicada, es decir, con que efectividad puedo distinguir entre lo normal y lo crítico.

Con la ayuda de este cálculo que estuvo a cargo del Dr. Gerardo Hernández García, de la sección de teoría y metodología de la ciencia del Cinvestav, de donde se decidió, que sería representativo tener una muestra de un mínimo de 30 personas. Para el estudio se convocó y requirió que las personas participaran de manera voluntaria, entendiendo que si tenemos de concentración de plomo en sangre hasta de 10 veces mayor este mínimo estaría excedido estadísticamente.

6.2 Criterios de inclusión y exclusión

Se seleccionaron ciertos criterios de inclusión y exclusión, con la finalidad de evitar factores que pudieran influir o generar un sesgo en el estudio.

Para los trabajadores no expuestos los criterios de inclusión fueron: 1) Nunca haber tenido exposición laboral a metales pesados y 2) que aceptaran participar en el estudio. Como factores de exclusión: 1) Padecer enfermedad renal crónica, 2) padecer diabetes mellitus, 3) consumir AINEs, α y β bloqueadores, y 4) tener alguna enfermedad o tratamiento crónico. En los dos muestreos se logró la participación de 19 personas de manera voluntaria, de las cuales, de acuerdo a los criterios indicados, 17 se incluyeron en el estudio.

Para los trabajadores expuestos a plomo los criterios de inclusión fueron: 1) Tener al menos 6 meses en el puesto de trabajo en la recicladora, 2) que acepten participar en el estudio. Y como factores de exclusión: 1) Padecer enfermedad renal crónica, 2) padecer diabetes mellitus, 3) consumir AINEs, α y β bloqueadores, y 4) tener alguna enfermedad o tratamiento crónico. De igual manera en los dos muestreos a la empresa se logró la participación de 30 trabajadores de manera voluntaria, de los cuales, de acuerdo a los criterios indicados, 24 se incluyeron en el estudio.

6.3 Obtención de muestras de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre por punción venosa del brazo de 17 trabajadores no expuestos y 24 expuestos, previa firma de consentimiento informado y con las condiciones éticas internacionales de acuerdo a la declaración de Helsinki. El procedimiento para toma de muestra con previa asepsia, fue mediante sistema de aguja y adaptador para tubos "Vacutainer" con vacío, estos últimos se rotularon previamente de acuerdo a un folio en un expediente personal. La sangre se colectó en tubos con

heparina y K₂EDTA, una vez tomada la muestra se homogenizó lentamente de 10 a 15 veces para evitar coágulos. Se llevaron a cabo dos muestreos por cada población:

- Trabajadores no expuestos: 17-Noviembre-2017 y 15-Julio-2018.
- Trabajadores expuestos: 27-Noviembre-2017 y 19-Junio-2018.

6.4 Transporte de muestras de sangre

Las muestras de sangre con anticoagulante (heparina y K₂EDTA) se colocaron en orden en gradillas de plástico e introdujeron en cajas de unicel junto con geles previamente congelados para propiciar un ambiente fresco y de temperatura aproximada de 4°C. Así mismo, las cajas de unicel fueron selladas perfectamente con cinta adhesiva y con ello conservar las muestras durante su traslado al laboratorio de Bioquímica Médica ubicado en el departamento de Bioquímica del CINVESTAV en la Ciudad de México. A su llegada al laboratorio las muestras se homogenizaron lentamente en un mezclador por 5 minutos y después de 3 a 4 veces manualmente, y se alicuotaron en diferentes tubos eppendorf para cada una de las determinaciones.

6.5 Concentración de plomo en sangre

La concentración de plomo en sangre se determinó por voltimetría con un Analizador de Plomo modelo 3010B (ESA), la cual se reporta como µg de plomo por decilitro de sangre (µg/dL). La precisión del análisis fue del 87-104% (usando calibradores Hi y Lo de ESA) con un límite de detección de 1 µg/dL (Aguilar-Dorado *et al.*, 2014).

6.6 Determinación de microhematocrito

Las muestras de sangre con heparina se mezclaron lentamente durante 5 minutos, una vez homogenizada la muestra, se procedió a realizar el microhematocrito por duplicado llenando un tubo capilar hasta las dos terceras partes, dejando que la sangre fluyera por capilaridad y sellando con fuego uno de los extremos con la ayuda de un mechero de bunsen. Posterior a esto, los tubos capilares se colocaron en una microcentrifuga International IEC micro-capillary modelo MB durante 3 minutos y una vez separada la sangre en los elementos corpusculares y plasma se colocaron los capilares uno por uno en un lector para hematocrito International IEC micro-capillary, obteniendo resultados en porcentaje; valor requerido para calcular la actividad de la enzima δ-ALAD.

6.7 Actividad de la enzima ácido delta aminolevulínico deshidratasa (δ -ALAD)

La actividad de la enzima δ -ALAD es utilizada como un marcador de intoxicación con plomo, la cual se determinó espectrofotométricamente con el equipo UV/VIS DU 650 (Beckman). La determinación se llevó a cabo conjuntando los métodos de Burch y Siegel (1971), el Método Estandarizado Europeo descrito por Berlín y Schaller (1974) y Redig (1991). Se alicuotaron muestras de 100 μ L de sangre total en tubos eppendorf por duplicado, enseguida se agregaron 350 μ L de Tritón X-100 al 0.24% para lisar los eritrocitos y se homogenizaron en vórtex para asegurar la lisis. Posterior a ello, se agregaron 250 μ L de ALA (ácido aminolevulínico) 20 mM para comenzar la reacción enzimática, una vez mezclada, la reacción se llevó a incubación en baño María durante 1 hora a 37 °C. Después de transcurrido este tiempo la reacción se detuvo con 625 μ L de ATC al 10%, con ello se generó la precipitación de proteínas y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Se obtuvieron 750 μ L de sobrenadante que se hicieron reaccionar con 750 μ L de reactivo de Ehrlich para desarrollar el color y se homogenizó en vórtex, para luego dejar la reacción 10 minutos en oscuridad. Una vez pasado este tiempo se realizó la lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 555 nm, teniendo en cuenta que el color observado es estable por alrededor de 30 minutos. Por tanto, la actividad enzimática se expresa en nmol de porfobilinógeno (PBG) por hora por ml de glóbulos rojos (nmol/hr/mL GR) (Aguilar-Dorado *et al.*, 2014).

6.8 Lipoperoxidación en eritrocitos

La peroxidación de lípidos es un marcador biológico de daño celular oxidativo. La cantidad de peroxidación de lípidos en los eritrocitos fue determinada como reportó Jain *et al.* (1989) y de igual manera Rendón-Ramírez *et al.* (2014), dicha técnica consiste en la medición de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Debido a que las muestras obtenidas eran sangre total, se realizaron 3 lavados del paquete celular con NaCl al 0.9%, para trabajar con 200 μ L de eritrocitos lavados los cuales se suspendieron en 800 μ L de PBS en tubos eppendorf, posterior a ello se agregaron 25 μ L de BHT y 500 μ L de TCA al 30%, que se homogenizó en vórtex, para llevar a incubación durante 2 horas en baño de hielo; transcurrido el tiempo y debido a la precipitación de proteínas se realizó una centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos, y una vez obtenido el sobrenadante, colocándose en tubos de ensaye 1 mL de sobrenadante más 75 μ L EDTA

0.1 M y 250 μ L TBA 1%, los tubos con la mezcla de reacción se taparon con canicas y se colocaron en agua hirviendo por tiempo de 15 minutos. Al término de esta incubación los tubos se colocaron de inmediato en hielo, se midió la absorbancia a 532 nm y 600 nm usando un espectrofotómetro UV/VIS DU 650 (Beckman). Las TBARS se expresaron en nmol de equivalentes de malondialdehído por mL de eritrocitos (nmol MDA/mL de GR) (Aguilar-Dorado *et al.*, 2014).

6.9 Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos y leucocitos

El método para la detección de fosfatidilserina en la monocapa externa de la membrana se realizó mediante la unión de Anexina V. La Anexina V-FITC se une a la fosfatidilserina con buena especificidad en presencia de cloruro de calcio 2.5 mM (Ernst *et al.*, 1994) solo en la monocapa externa de la membrana de las células ya que no es permeable, al tener unido isotiocianato de fluoresceína (FITC), las células a las cuáles se une la Anexina V-FITC presentan fluorescencia verde que puede ser determinada por citometría de flujo. El procedimiento consistió en un lavado de sangre total para obtener un paquete de eritrocitos, se realizó una dilución de eritrocitos (10 μ L de eritrocitos en 6.25 mL de PBS), de la cual se tomaron alícuotas de 200 μ L por duplicado, se hizo un lavado con buffer de unión, luego se incubó con 1 μ L de AV-FITC 5 min en baño de hielo, se hizo un lavado final con buffer de unión para remover el exceso de anexina. Finalmente, los eritrocitos se resuspendieron en 400 μ L de buffer de unión, y se analizaron en el citómetro de flujo BD LSRFortessa™ en los parámetros de SSC, FSC y fluorescencia para AV-FITC.

La metodología que se siguió para determinar la externalización de fosfatidilserina en leucocitos, se tomaron alícuotas de 20 μ L de sangre total, que se diluyó en 400 μ L de buffer de lisis de eritrocitos incubando por 30 min, luego se agregaron 200 μ L de buffer de unión y 1 μ L de AV-FITC incubando 5 min, y de igual manera se analizaron las muestras en el citómetro de flujo en los parámetros SSC, FSC y fluorescencia para AV-FITC.

Para evidenciar el proceso de máxima externalización de fosfatidilserina, se realizó la incubación de células (eritrocitos y leucocitos) con el ionóforo A23187 y calcio, con la finalidad de identificar el punto de corte para cuantificar las células positivas a Anexina V-FITC.

Para el caso de los eritrocitos; a partir de una alícuota de sangre total se hicieron lavados con PBS para obtener el paquete de eritrocitos y enseguida se hizo una suspensión a 16% de hematocrito en cloruro de calcio 1.2 mM, posterior a ello se incubó dicha suspensión con el ionóforo A23187 4 μ M durante 60 minutos a 37 °C (Kuypers *et al.*, 1996), al terminar se lavaron inmediatamente los eritrocitos con PBS con EDTA 2.5 mM, 3 veces con PBS con albúmina al 1% y finalmente una vez con PBS. Luego, estos eritrocitos se diluyen (10 μ L de eritrocitos en 6.25 mL de PBS) y se continua para la incubación con AV-FITC.

Para el caso de los leucocitos se probaron 2 métodos:

- *Aislamiento de leucocitos.* A partir de 6 mL de sangre total que se centrifugan a 3500 rpm 10 min, se obtuvo la capa leucocitaria que se coloca en buffer de lisis de eritrocitos (30 min a temperatura ambiente) para eliminar el remanente de eritrocitos, el tubo cónico se centrifugó a 6500 rpm 1 min para obtener un precipitado de células leucocitarias que se resuspendieron en 500 μ L de PBS. Luego se incubaron las alícuotas correspondientes en cloruro de calcio 1.2 mM, posterior a ello se incubó dicha suspensión con el ionóforo A23187 4 μ M, probando tiempos de 20 y 40 minutos a 37 °C, inmediatamente después, se lavaron los eritrocitos con PBS con EDTA 2.5 mM, 1 vez con PBS con albúmina al 1%, finalmente se incubaron los leucocitos en 400 μ L de buffer de unión con 1 μ L de AV-FITC, y se analizaron en el citómetro de flujo.
- *Leucocitos en sangre total.* Se tomaron alícuotas de 20 μ L de sangre total por cada muestra por duplicado, se diluyeron con 980 μ L de PBS, luego se incubaron en presencia de cloruro de calcio 1.2 mM y el ionóforo A23187 4 μ M a tiempo de 20 y 40 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo un lavado con PBS con EDTA 2.5 mM y, 1 vez con PBS con albúmina al 1%. Se centrifuga la muestra (6500 rpm 1 min, a temperatura ambiente) para resuspender en 400 μ L de buffer de lisis (30 min) luego se colocan 200 μ L de buffer de unión más 1 μ L de AV-FITC para de inmediato analizarse en el citómetro de flujo.

6.10 Concentración de TNF- α en plasma

Se utilizó un kit de ELISA MAXTM Standard Sets (BioLegend) para la determinación de TNF- α humano, el cual contiene anticuerpos de captura y detección, la proteína recombinante estándar, y avidina-HRP requeridos para la precisa cuantificación de TNF- α humano natural y recombinante.

Primero se colocaron 100 μ L de solución diluida de anticuerpo de captura (anticuerpo monoclonal de ratón específico para TNF- α humano) en una placa de 96 pozos, que se incubó durante la noche entre 2°C y 8°C. Se lavó la placa 4 veces (PBS + 0.05% Tween-20), para luego bloquear la placa por adición de 200 μ L de diluyente de ensayo (1% BSA en PBS) e incubar a temperatura ambiente por 1 hora con agitación. Se lavó la placa 4 veces, 100 μ L de los estándares y muestras fueron añadidos a los pozos, y el TNF- α se unió al anticuerpo de captura inmovilizado, se incubó por 2 horas, luego, se lavó la placa 4 veces, después se añadió 100 μ L de anticuerpo de detección monoclonal biotinilado de ratón anti-TNF- α humano, durante 1 hora se incubó produciendo un “sándwich” anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Se lavó 4 veces, una solución diluida de avidina-peroxidasa de rábano picante fue subsecuentemente añadida (100 μ L por 30 min de incubación), seguido por 100 μ L de la solución sustrato TMB que se incubó en oscuridad por 15 min, produciendo un color azul en proporción a la concentración de TNF- α presente en la muestra. Finalmente, 100 μ L de la solución de paro (H₂SO₄ 2N) se añadieron donde se produjo el cambio de color de la reacción azul a amarillo, y la absorbancia de los micropozos fue leída a 450 nm con un lector de microplacas.

6.11 Estimulación de TNF- α con lipopolisacárido

Para evaluar la capacidad de producción y liberación de TNF- α por leucocitos se realizó la estimulación de alícuotas de 500 μ L de sangre total con K₂EDTA con una solución de LPS (Derivado de *Escherichia coli*, serotipo 055:B5, Sigma) a una concentración final de 10 ng/mL (Abbasi *et al.*, 2013). Después de la incubación por 2 horas a 37°C, la muestra fue centrifugada a 3000 rpm 10 minutos para obtener el sobrenadante, el cual se colocó en tubos eppendorf y se guardó a -70°C hasta el día de ensayo. A las muestras de sobrenadante se les determinó la concentración de TNF- α mediante el kit de ELISA MAXTM Standard Sets (BioLegend).

6.12 Análisis de resultados

Para el análisis estadístico, se usó el programa GraphPad Prism 5 para la construcción de gráficos de barras para representar la media y la desviación estándar, y la construcción de gráficos de “boxplot” para representar la dispersión de los datos. Para comparar los resultados de los trabajadores expuestos respecto a los no expuestos, se usó la prueba estándar paramétrica, t-student no pareada (para muestras independientes) y t-student pareada (para muestras dependientes) según corresponda el análisis, además, se realizó la prueba U de Mann-Whitney ó prueba de Wilcoxon que es la prueba estándar no paramétrica para muestras independientes. Se utilizó regresión lineal y el coeficiente de correlación de Pearson, para la correlación entre parámetros estudiados. Un análisis de chi-cuadrada (X^2) para determinar la relación de variables.

7. Resultados

7.1 Concentración de plomo en sangre

En la figura 10a, se muestran los valores de la media y la desviación estándar para la concentración de plomo en sangre del grupo no expuesto ($2.5 \pm 1.7 \mu\text{g/dL}$) y el grupo expuesto ($64.6 \pm 30.1 \mu\text{g/dL}$), con 25 veces mayor concentración de plomo en sangre, diferencia estadísticamente significativa, para este parámetro de diagnóstico de exposición. Los trabajadores no expuestos presentaron concentraciones por debajo de $10 \mu\text{g/dL}$, mientras que los trabajadores expuestos presentaron concentraciones por encima de $10 \mu\text{g/dL}$ e incluso por arriba de $30 \mu\text{g/dL}$, que de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-047-SSA1-2011 este último valor es el Índice Biológico de Exposición para personal ocupacionalmente expuesto a plomo. En la figura 10b, se presenta la dispersión de los datos en graficas de “boxplot” de las concentraciones de plomo en sangre de ambos grupos, se observa una gran dispersión en las concentraciones de plomo de los trabajadores expuestos y que la totalidad de las mismas están por encima del valor superior de los trabajadores no expuestos y un análisis no paramétrico para muestras independientes mostro diferencia estadística significativa.

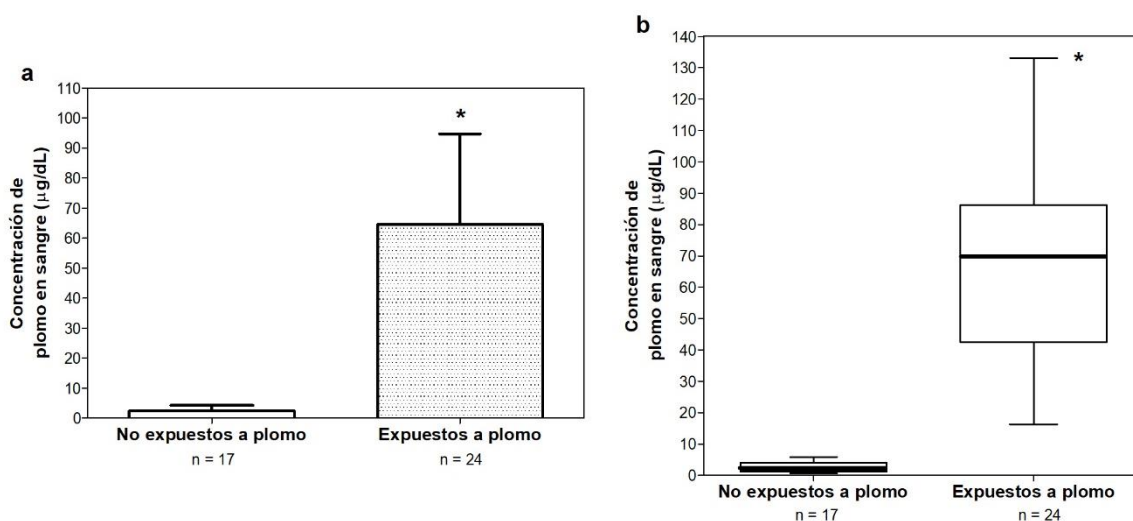


Fig. 10. Concentración de plomo en sangre determinada por voltametría en trabajadores no expuestos (n = 17) y trabajadores expuestos a plomo (n = 24). En a) gráfica de barras, se presenta la media y la desviación estándar, *p < 0.0001, según t-student para muestras independientes y en b) gráfica de “boxplot”, se divide por cuartiles, *p < 0.0001, según Wilcoxon.

7.2 Actividad δ -ALAD

Los valores de la media y la desviación estándar para la actividad de la enzima δ -ALAD para trabajadores no expuestos y expuestos a plomo fueron 1083 ± 320 y 171 ± 98 respectivamente (Fig. 11a), los trabajadores expuestos a plomo tienen apenas el 15 % de actividad de la enzima respecto a los no expuestos, diferencia estadísticamente significativa por pruebas no paramétricas. Cabe destacar que actividades normales para esta enzima van de 500 a 1000 nmol PBG/h/mL GR, en la figura 11b se muestra como la actividad está prácticamente por debajo de 500 para los trabajadores expuestos a plomo.

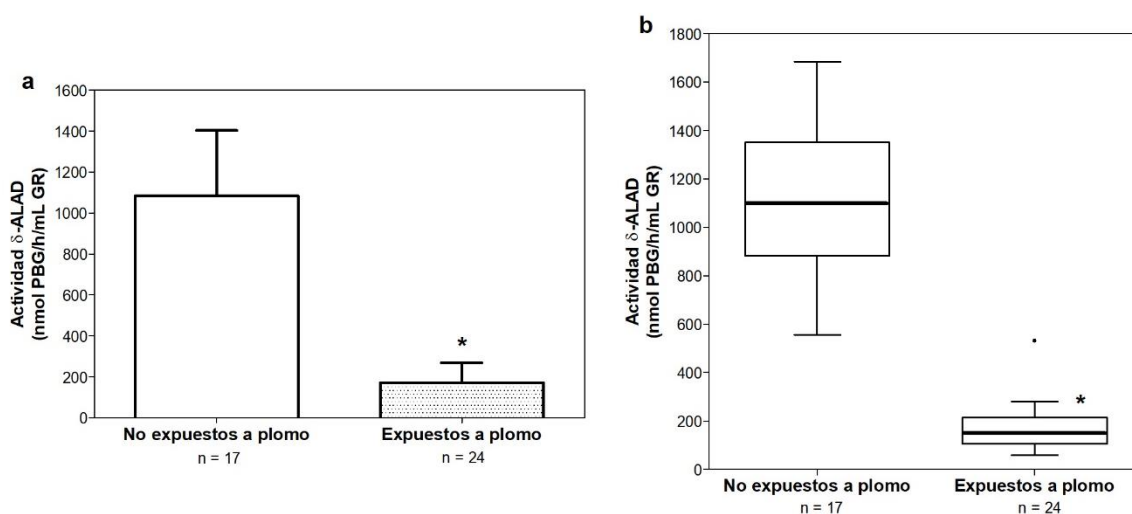


Fig. 11. Actividad de la enzima δ -aminolevulinico deshidratasa determinada por espectrofotometría en trabajadores no expuestos (n = 17) y trabajadores expuestos a plomo (n = 24). En a) gráfica de barras, se presenta la media y desviación estándar, *p < 0.0001, según t-student para muestras independientes y en b) gráfica de "boxplot", se divide por cuartiles, *p < 0.0001, según Wilcoxon.

7.3 Relación de la concentración de plomo con respecto a la actividad de la enzima δ -ALAD.

Se encontró una correlación negativa ($R^2 = 0.6103$) con significancia estadística entre la concentración de plomo en sangre y la actividad de la δ -ALAD, lo que indica que la actividad de la enzima de los trabajadores expuestos, se reduce a mayor concentración de plomo en sangre, como se observa en la gráfica de la figura 12 a partir de la concentración de 20 μ g/dL de plomo en sangre, la reducción de la actividad es muy

notable y ha alcanzado los niveles más bajos, por lo que se observan pocos cambios después de esa concentración (Fig. 12).

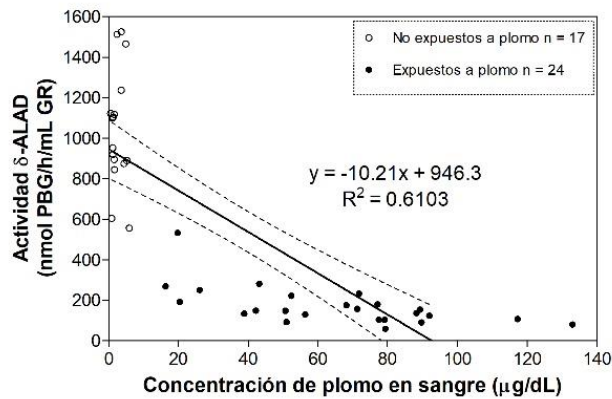


Fig. 12. Regresión lineal y correlación entre la concentración de plomo y actividad δ -ALAD de (○) trabajadores no expuestos ($n = 17$) y (●) expuestos a plomo ($n = 24$). Se presenta la ecuación de la recta (línea sólida) con los límites de confianza (líneas punteadas) y el coeficiente de correlación $p < 0.0001$, según Pearson. Se muestra la ecuación de la recta.

7.4 Lipoperoxidación

Los trabajadores expuestos a plomo tienen una lipoperoxidación 27% mayor (0.85 ± 0.08 nmol MDA/mL GR) que los eritrocitos de los trabajadores no expuestos (0.67 ± 0.11 nmol MDA/mL GR) (Fig. 13a). En la figura 13b se muestra la dispersión de los datos por gráficas de "boxplot", se puede observar que el 75% de los trabajadores expuestos está por arriba del 75% de los trabajadores no expuestos con diferencia estadística significativa por pruebas no paramétricas.

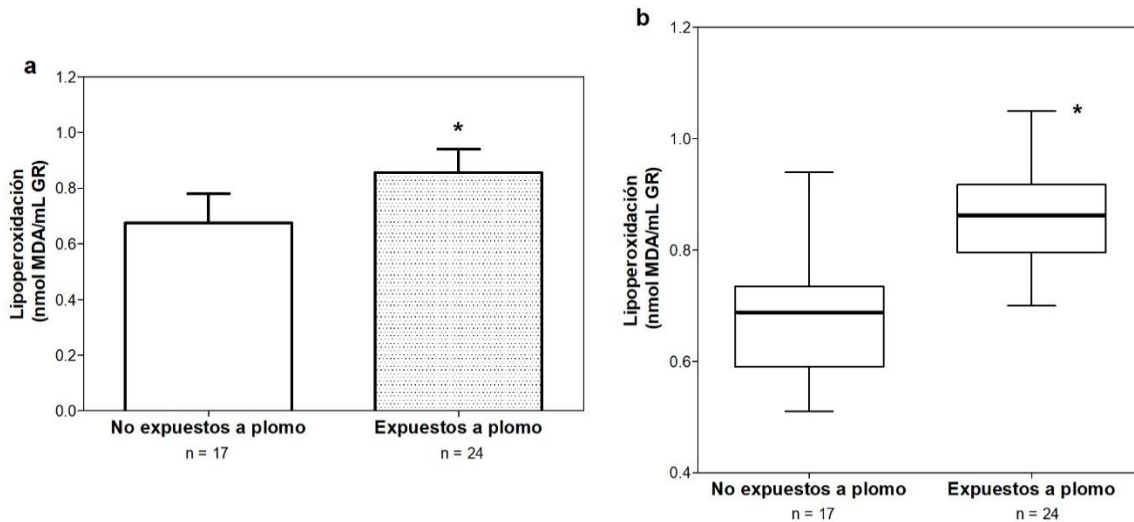


Fig. 13. Lipoperoxidación determinada a través de TBARs por espectrofotometría en trabajadores no expuestos (n = 17) y trabajadores expuestos (n = 24). En a) gráfica de barras se presenta la media y la desviación estándar *p < 0.0001, según t-student para muestras independientes y en b) gráfica de "boxplot", se divide por cuartiles, *p < 0.0001, según Wilcoxon.

7.5 Relación de la concentración de plomo respecto a la lipoperoxidación

La correlación positiva entre la concentración de plomo en sangre respecto a la lipoperoxidación fue de $R^2 = 0.3088$, la cual se considera baja, pero que resulto estadísticamente significativa, reforzando que hay daño oxidativo en los eritrocitos de los trabajadores intoxicados por plomo (Fig. 14).

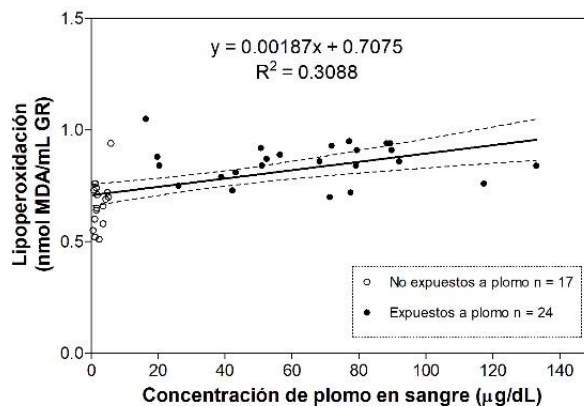


Fig. 14. Regresión lineal y correlación entre la concentración de plomo y la lipoperoxidación de (○) trabajadores no expuestos (n = 17) y (●) expuestos a plomo (n = 24). Se presenta la ecuación de la recta (línea sólida) con los límites de confianza (líneas punteadas) y el coeficiente de correlación. p = 0.0002 según Pearson. Se muestra la ecuación de la recta.

7.6 Relación de la actividad de la enzima δ -ALAD respecto a la lipoperoxidación

En la figura 15 se muestra que existe una correlación negativa y estadísticamente significativa con $R^2 = 0.5158$ entre la actividad de la δ -ALAD y la lipoperoxidación en trabajadores no expuesto y expuestos a plomo, teniendo mayor lipoperoxidación en trabajadores con la menor actividad enzimática.

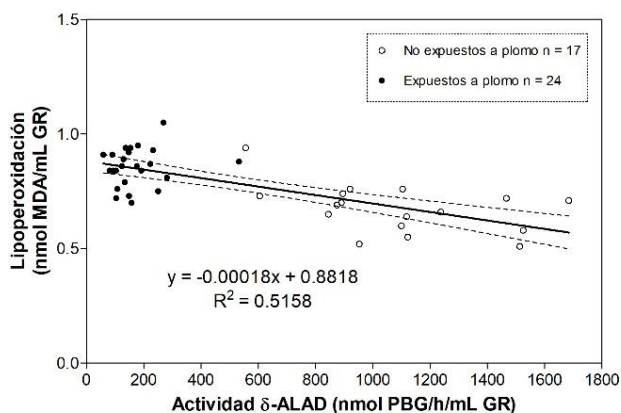


Fig. 15. Regresión lineal y correlación entre la actividad δ -ALAD y la lipoperoxidación de (○) trabajadores no expuestos (n = 17) y (●) expuestos a plomo (n = 24). Se presenta la ecuación de la recta (línea sólida) con los límites de confianza (líneas punteadas) y el coeficiente de correlación. $p < 0.0001$ según Pearson. Se muestra la ecuación de la recta.

7.7 Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos

La prueba de detección de externalización de fosfatidilserina en la monocapa externa de la membrana de los eritrocitos se utiliza como parámetro de eriptosis, en la figura 16 se muestra datos representativos de una determinación en forma de gráfica de “dotplot” y el histograma de frecuencias, encontrando que el trabajador expuesto tiene una clara diferencia con el no expuesto y que es posible detectar las diferencias con estas determinaciones.

Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de trabajadores, como se observa en la figura 17a, los trabajadores expuestos a plomo (0.5 ± 0.4 % de unión a anexina V) tienen un 60% mayor unión de anexina con respecto a los no expuesto (0.8 ± 0.3 % de unión a anexina V). En la figura 17b, el 75 % de los trabajadores expuestos están por arriba de la mediana (50%) de los trabajadores no expuestos, además el gráfico demuestra que la dispersión de los datos es diferente en

los dos grupos, mostrando que los trabajadores no expuestos pueden tener valores de cero y algunos trabajadores expuestos tienen valores por debajo de 0.5 pero no se reportan ceros; el análisis no paramétrico indicó que estadísticamente son diferentes.

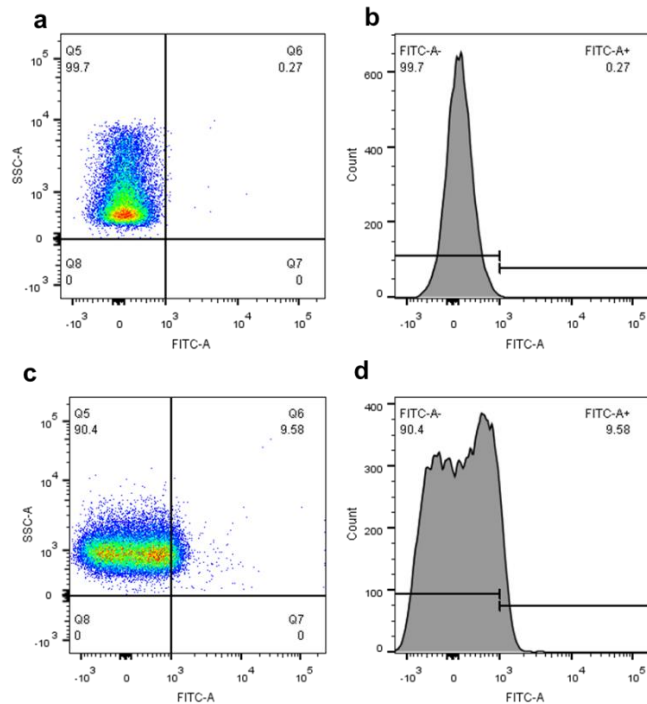


Fig. 16. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos por citometría de flujo, en la parte superior derecha de cada figura se indica el % de células positivas a anexina-V-FITC. En (a) y (c) se representan las gráficas de “dotplot” que muestran la población de eritrocitos y en (b) y (d) el histograma de frecuencias de la población eritrocitaria. (a) y (b) corresponden a un trabajador no expuesto; (c) y (d) a un trabajador expuesto a plomo. En (b) y (d) la marca de la línea horizontal, indica el punto de corte para poder cuantificar las células positivas a anexina-V-FITC.

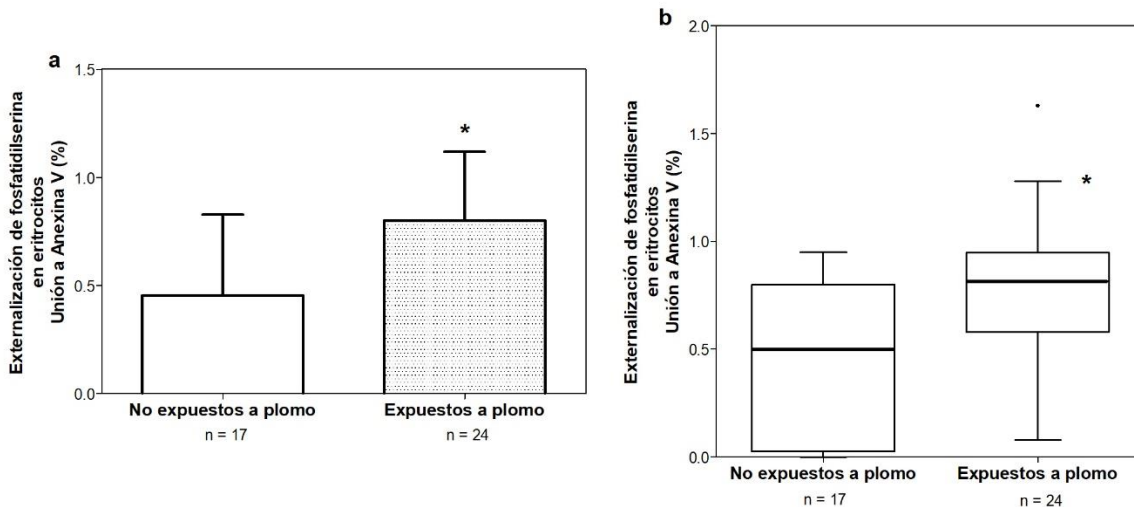


Fig. 17. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos medida por la unión de anexina V-FITC por citometría de flujo en trabajadores no expuestos (n = 17) y trabajadores expuestos a plomo (n = 24). En a) gráfica de barras se presenta la media y la desviación estándar, *p = 0.0027, según t-student para muestras independientes y en b) gráfica de “boxplot”, se divide por cuartiles, *p = 0.0128, según Wilcoxon.

7.8 Externalización de fosfatidilserina en leucocitos

De los dos métodos que se probaron para analizar la máxima externalización, el método de elección fue en sangre total, pues la visualización de las poblaciones leucocitarias por citometría de flujo fue la que presentó la mejor calidad de separación y cuantificación (Fig. 18). En la figura 19 se muestra datos representativos de una determinación de forma de gráfica de “dotplot” y el histograma de frecuencias, observando que el trabajador expuesto tiene una notable diferencia con el no expuesto, esta diferencia es posible detectarla con estas determinaciones.

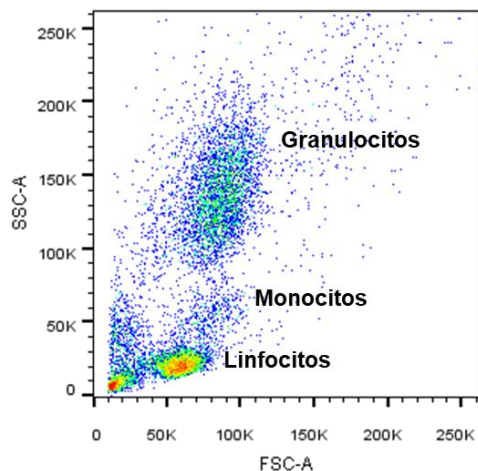


Fig. 18. Poblaciones leucocitarias identificadas por citometría de flujo. Gráfico de “dot plot” donde se identifican las poblaciones de leucocitos, en los parámetros de FSC (tamaño) y SSC (granularidad).

En leucocitos de trabajadores expuestos a plomo (18.1 ± 8.5 , % de unión de anexina V), se encontró una mayor externalización de fosfatidilserina (74%) con respecto a los trabajadores no expuestos (10.4 ± 6.0 , % de unión de anexina V) (Fig. 20a). La gráfica de “boxplot” (Fig. 20b) muestra la gran variación que hay en los datos de ambos grupos, inclusive el 75 % de la población de los expuestos está por arriba del 50% de los no expuestos. En el grupo no expuesto, el 50 % de los valores se dispersan entre el 5 y 15 % de unión a anexina aproximadamente, en cambio en el grupo expuesto el 50 % se dispersa y con mayor variación alrededor de 10 y 30% de unión a anexina, sin embargo, la prueba no paramétrica indica diferencia estadísticamente significativa. Confirmando que existe un mayor nivel de apoptosis en los eritrocitos de los trabajadores expuestos a plomo.

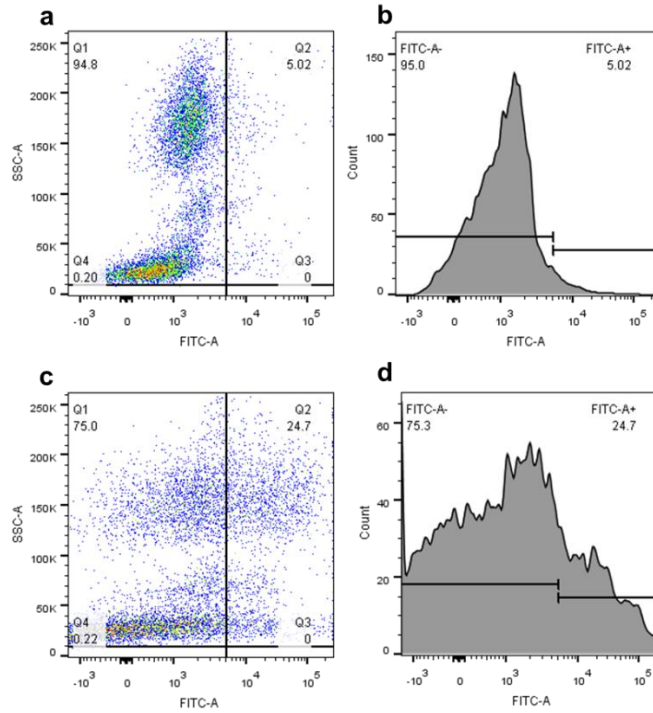


Fig. 19. Externalización de fosfatidilserina en leucocitos por citometría de flujo, en la parte superior derecha de cada figura se indica el % de células positivas a anexina-V-FITC. En (a) y (c) se representan las gráficas de “dot plot” que muestran la población de leucocitos y en (b) y (d) el histograma de frecuencias de la población leucocitaria. (a) y (b) corresponden a un trabajador no expuesto; (c) y (d) a un trabajador expuesto a plomo. En (b) y (d) la marca de la línea horizontal, indica el punto de corte para poder cuantificar las células positivas a anexina-V-FITC.

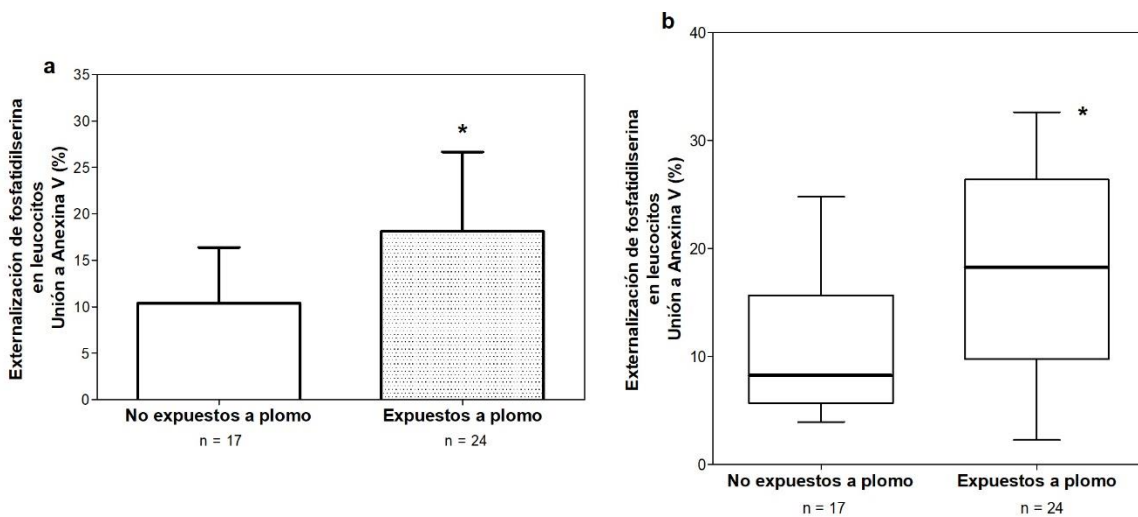


Fig. 20. Externalización de fosfatidilserina en leucocitos medida por la unión de anexina V-FITC por citometría de flujo de trabajadores no expuestos ($n = 17$) y trabajadores expuestos a plomo ($n = 24$). En a) gráfica de barras se presenta la media y la desviación estándar, $*p = 0.0026$, según t-student para muestras independientes y en b) gráfica de “boxplot”, se divide por cuartiles, $*p = 0.0048$, según Wilcoxon.

7.9 Concentración de TNF- δ en plasma

Para evaluar un factor del estado pro-inflamatorio de los trabajadores, se midió la concentración de TNF- α en plasma que es una de las citocinas involucrada en la defensa del hospedero, la inflamación y la apoptosis. En la figura 21a se muestran los valores de media y desviación estándar para el grupo de trabajadores no expuestos y expuestos a plomo 8.7 ± 2.1 pg/mL y 7.9 ± 0.2 pg/mL, respectivamente. No se encontró diferencia estadística significativa entre los dos grupos, el análisis de la prueba no paramétrica tampoco se encontró diferencia en las poblaciones como lo expone la figura 21b, donde se observa que la dispersión y la variabilidad de las poblaciones es similar en cuanto a los valores de TNF- α .

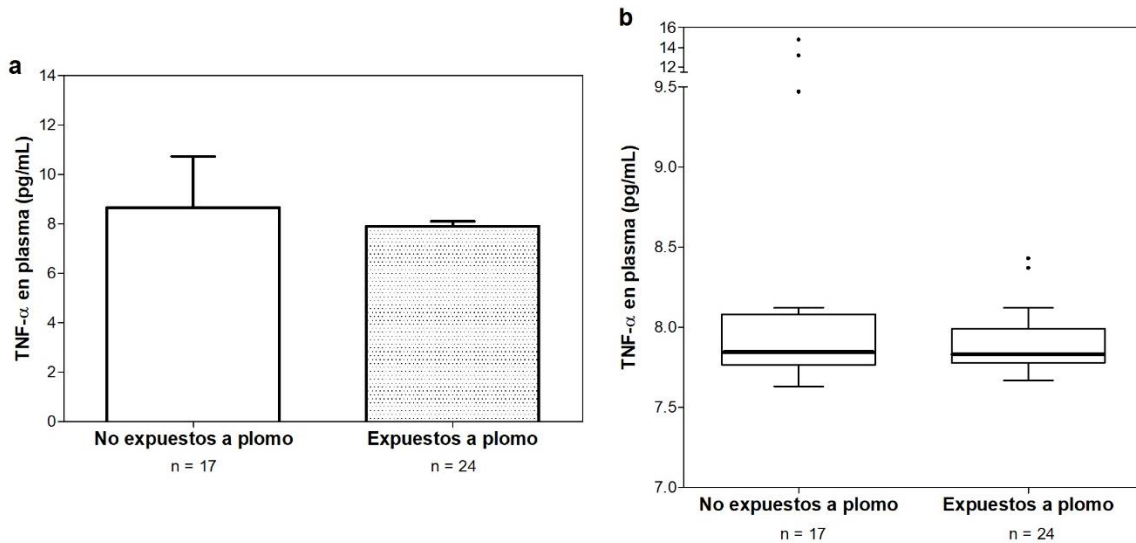


Fig. 21. Concentración de TNF- α en plasma determinada por ELISA en trabajadores no expuestos (n = 17) y trabajadores expuestos a plomo (n = 24). En a) gráfica de barras, se presenta la media y desviación estándar, $p = 0.0807$, según t-student para muestras independientes y en b) gráfica de "boxplot", se divide por cuartiles, $p = 0.6331$, según Wilcoxon.

7.10 Estimulación de leucocitos con lipopolisacárido para la secreción de TNF- α

La incubación de leucocitos con LPS incrementó la liberación de TNF- α en trabajadores no expuestos y expuestos a plomo. Como se muestra en la figura 22a y 22b no existe diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de TNF- α estimuladas por LPS entre leucocitos de los trabajadores no expuestos y expuestos a

plomo (3.3 y 3.5 veces, respectivamente). Sin embargo, la variabilidad es notable en ambos grupos pues en el 50% de los trabajadores expuestos las concentraciones ante el estímulo van de 20 a 40/mL, además hay 3 valores atípicos que están sobre el límite superior de los no expuestos, en cambio en los no expuestos el 50% presenta concentraciones de 20 a 60 pg/mL ante el estímulo y con más dispersión (Fig. 22b).

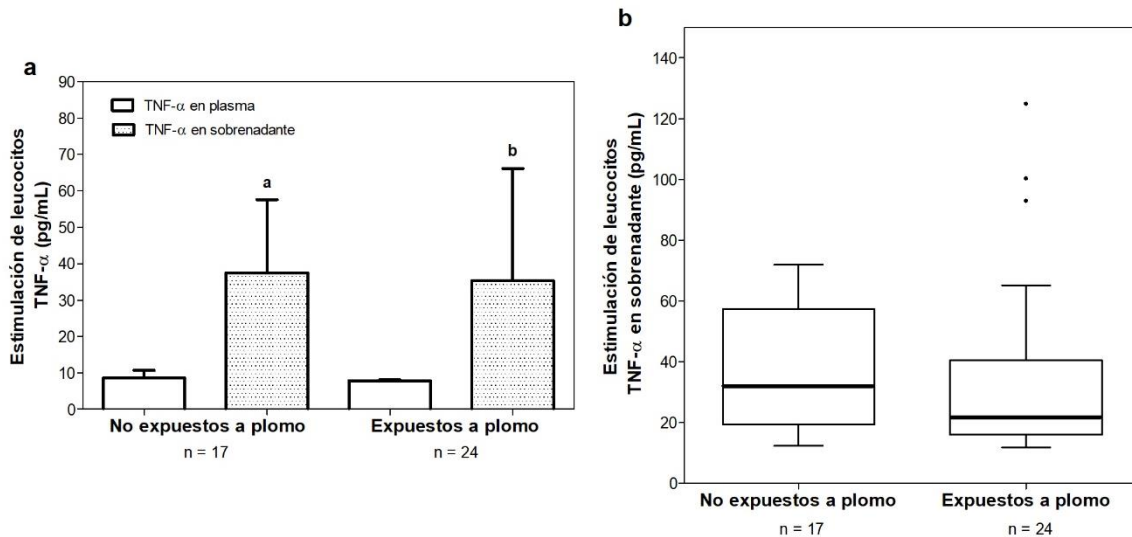


Fig. 22. Concentración de TNF- α ante la estimulación de leucocitos con LPS; a) Media y desviación estándar de la concentración de TNF- α en el plasma (barras abiertas) y la concentración en el sobrenadante después de la estimulación de leucocitos con LPS en sangre total (barras sombreadas), en trabajadores no expuestos (n = 17) y trabajadores expuestos a plomo (n = 24). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0002$). b) gráfica de "boxplot", se divide por cuartiles $p = 0.2443$, según Wilcoxon.

La dispersión que se muestra en la figura 22b dio pauta para hacer una estratificación de los datos, en base a trabajadores que presentaron menor y mayor respuesta al estímulo, tomando como punto de corte 20 pg/mL pues arriba de este valor están el 75% de los trabajadores no expuestos y, aproximadamente el 50% de los trabajadores expuestos por debajo de dicho valor, al realizar la clasificación observamos que el 42% de los trabajadores expuestos muestran menor respuesta al estímulo que los trabajadores no expuestos con un 24% y que es estadísticamente significativo ($p = 0.0103$) mediante la prueba de X^2 (Fig. 23).

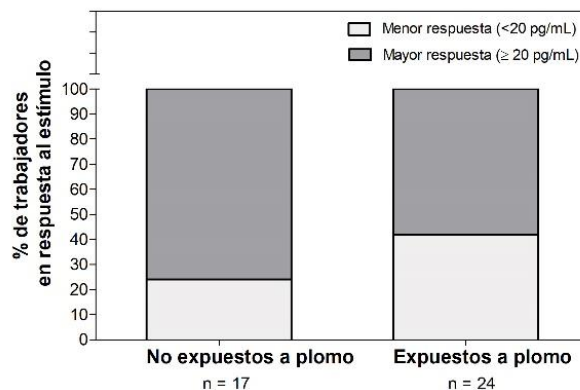


Fig. 23. Porcentaje de trabajadores no expuestos (n = 17) y expuestos a plomo (n = 24) que presentan menor respuesta (barras claras) y mayor respuesta (barras oscuras) para la producción y liberación de TNF- α por leucocitos estimulados con LPS en sangre total. $p < 0.0002$, según X^2 .

7.11 Historia clínica toxicológica

Los resultados de la información positiva de la historia clínica con énfasis toxicológico y el estado pro-inflamatorio en trabajadores no expuestos y expuestos a plomo se muestran en la tabla 6, es claro que los trabajadores expuestos tienen signos y síntomas correspondientes a la intoxicación con plomo y a estados proinflamatorios con respecto a los no expuestos.

Tabla 6. Porcentaje de pacientes que presentan signos y síntomas clínicos asociados a la intoxicación por plomo y estados pro-inflamatorios en trabajadores no expuestos y expuestos a plomo.

| | Trabajadores no expuestos a plomo (%) | Trabajadores expuestos a plomo (%) * |
|--|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Mareos | 16 | 74 |
| Dolores de cabeza | 32 | 91 |
| Parestesias | 8 | 40 |
| Paresias | 4 | 17 |
| Cólicos abdominales | 20 | 83 |
| Mialgias | 12 | 66 |
| Infecciones frecuentes | 16 | 77 |
| Alteraciones en la coordinación motora | 8 | 89 |

* Diferencia estadística significativa, $p < 0.0001$, según X^2 .

8. Discusión

El estudio de los pacientes se realizó con énfasis toxicológico y de bioquímica molecular en la población de trabajadores de una recicladora de baterías de León, Guanajuato, teniendo como población no expuesta habitantes de Ojo de Agua de Ballesteros, Salvatierra, Guanajuato, con un estudio comparativo y descriptivo. Se generaron acuerdos tanto con los directivos y los trabajadores de la empresa, así como con los trabajadores habitantes de la comunidad de Salvatierra para realizar el estudio, bajo consentimiento informado. En ambas poblaciones se realizó trabajo comunitario de salud, orientación y pruebas clínicas complementarias para el auxilio en el diagnóstico general de los trabajadores. Los objetivos y las pruebas de laboratorio se plantearon desde el punto de vista clínico, toxicológico y bioquímico, siguiendo las especificaciones de normas nacionales e internacionales y con ello, las aprobaciones y registros del proyecto quedaron autorizadas ante los comités de ética y autoridades correspondientes. Los trabajadores expuestos y no expuestos presentaron un nivel socioeconómico y estilo de vida parecido, teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión; con la historia clínica toxicológica se eligieron los trabajadores indicados para realizar las pruebas de laboratorio pertinentes. Se consideró al momento del estudio que los trabajadores expuestos tuvieran más de 6 meses en la empresa y para los no expuestos que no tuvieran ningún antecedente de trabajo en empresas donde se procese plomo, esto para aislar al máximo la variable de exposición a plomo, lo que permitió la comparación entre ambos grupos en cuanto a los aspectos moleculares. Las poblaciones con las características ya mencionadas constituyen una oportunidad excepcional para estudiar efectos de la intoxicación por plomo, con diversos parámetros y sistemas de daño y respuesta.

8.1 Intoxicación en trabajadores expuestos a plomo

Los principales indicadores biológicos de intoxicación por plomo son: la concentración de plomo en sangre y la actividad de la enzima δ -ALAD, ambos permiten afirmar que el plomo se está absorbiendo y que ejerce efectos específicos moleculares y de daño sobre las macromoléculas. Los trabajadores expuestos presentaron 25 veces mayor concentración de plomo en sangre respecto a los no expuestos, indicando claramente que los trabajadores tienen exposición a plomo y que lo absorben muy por

arriba de lo aceptado (NOM-047-SSA1; OMS; Valentino *et al.*, 2007). Lo anterior indica que la industria no cuenta con procesos controlados, la seguridad es deficiente y no existe monitoreo en cuanto a los desechos y aunado a ello, el trabajador no aplica las medidas de seguridad adecuadas. Este tipo de resultados, de pacientes con altas concentraciones de plomo en sangre se observa en otros países en vías de desarrollo (Gottesfeld y Pokhrel, 2011), sin embargo existen también países en vías de desarrollo donde tienen este tipo de industrias y los trabajadores presentan bajas concentraciones de plomo (Di Lorenzo *et al.*, 2006). Lo anterior muestra como la implementación de medidas de seguridad a nivel de proceso industrial y a nivel del personal, en cada país es diferente, por lo que las medidas de seguridad y su correcta aplicación puede reflejarse en bajas o altas concentraciones de plomo en sangre, según el caso.

En el presente trabajo empleamos la voltimetría, que es la técnica más rápida y eficaz para la determinación de plomo en sangre, en el diagnóstico de la absorción; las ventajas de esta técnica respecto a otras, es su alta precisión, reproducibilidad y sensibilidad, con la capacidad de evaluar plomo en sangre en un intervalo de 1-100 $\mu\text{g/dL}$ (NOM-199-SSA1-2000).

Los resultados indican que la exposición y absorción de plomo es de grandes magnitudes, ya que en los trabajadores expuestos la concentración de plomo en sangre fue de 64.6 $\mu\text{g/dL}$. El valor de la media está dos veces por arriba de 30 $\mu\text{g/dL}$, que es el Índice Biológico de Exposición para plomo según la NOM-047-SSA1 para personal ocupacionalmente expuesto, lo cual indica, como se ha mencionado, un mal manejo de la normas de seguridad dentro de la empresa. En contraste con otros países, donde autores han reportado concentraciones menores a este valor, incluso para trabajadores de una recicladora de baterías (Di Lorenzo *et al.*, 2006). En México se siguen registrando trabajadores con concentraciones de plomo en sangre hasta con 60-80 $\mu\text{g/dL}$ o más, así que es evidente que el sistema de salud no considera los daños profundos cuando hay una exposición crónica al metal y aunado a ello no existe un sistema para canalizar a tratamiento a los trabajadores con altas concentraciones de plomo en población ocupacionalmente expuesta.

Para la población de trabajadores no expuestos a plomo aplica la norma NOM-199-SSA1-2000, la cual establece que la máxima concentración de plomo en sangre para

la población no ocupacionalmente expuestas es de 25 µg/dL. Además, que el valor criterio para la concentración de plomo en sangre en niños, mujeres embarazadas y en periodo de lactancia es de 10 µg/dL; sin embargo, los valores que indica la norma son muy altos comparados con los que establece la OMS y el Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, que es de 5 µg/dL para toda la población (OMS, 2016). En México el monitoreo en las industrias es deficiente y en el ambiente fuera de la CDMX no se evalúa la concentración de plomo en el ambiente, aun cuando se detectan problemas evidentes de contaminación, como en ciudades altamente industrializadas.

8.2 Plomo y actividad δ-ALAD

A pesar de que plomo en sangre es la prueba de mayor valor para el diagnóstico, deben realizarse pruebas que indiquen el daño por este metal, la actividad de la enzima δ-ALAD en sangre es una actividad residual, esta enzima participa en la síntesis del grupo hemo en el eritroblasto, los trabajadores expuestos presentaron apenas el 15% de la actividad de la enzima respecto al grupo no expuesto. Estos parámetros al estar correlacionados ($R^2 = 0.6103$) confirman la cercana relación entre la concentración de plomo en sangre y la inhibición de la actividad de la enzima, observando que a partir de 20 µg/dL plomo se presentaron actividades notablemente menores a 500 nmol PBG/h/mL GR incluso a mayores niveles de plomo, esta correlación negativa ha sido también reportada ya en trabajos previos de nuestro laboratorio y por otros investigadores (Stoleski *et al.*, 2008), pues este metal es capaz de inhibir a las enzima de 3 formas: 1) formando mercáptidos, 2) desplazando al Zn^{2+} , que es cofactor de esta enzima y 3) oxidándola. El estudio de la actividad de la enzima complementa el incremento de la concentración de plomo en sangre, en diagnóstico de intoxicación por el metal.

La enzima δ-ALAD, es el marcador principal de intoxicación por plomo ¿por qué no otra enzima? Se han reportado experimentos en los que se han tratado eritrocitos con bajas y altas concentraciones de diferentes metales como zinc, cadmio, cobre, mercurio y plomo (en un rango de 10^{-7} M hasta 10^{-2} M) y se ha observado una disminución consistente y drástica de la actividad de la enzima δ-ALAD debido a plomo de manera preferencial (Fujita e Ishihara, 1988) y esto se explica debido a que el plomo tiene más afinidad por los grupos SH del sistema enzimático involucrado (Krajnovit-Ozretik y Ozretit, 1980) dando lugar a la formación de mercáptidos (compuestos formados por un metal y

un mercaptano). El efecto inhibitor del plomo en δ -ALAD es un proceso reversible experimentalmente, así que una reactivación relevante ocurre después de la adición de zinc *in vitro*. Finelli (1977) describió resultados muy similares en un caso de terapia con plomo que sugiere que el efecto restaurador del zinc en individuos expuestos al plomo está presumiblemente relacionado con la unión competitiva de los iones plomo o zinc a δ -ALAD: uno que actúa como inhibidor, el otro como activador, cuando las concentraciones de plomo en sangre son moderadamente elevadas. A partir de estos resultados se puede esperar que para la reactivación del δ -ALAD ya inhibida por el plomo, se requiera una concentración relativamente alta de zinc, lo que indica que esta enzima tiene mayor afinidad por el plomo que por el zinc (Krajnovit-Ozretik y Ozretik, 1980), aunque no se ha reportado valores puntuales de la afinidad de la δ -ALAD por el zinc o plomo. Por lo explicado anteriormente, el efecto inhibitor del plomo hacia δ -ALAD no es proporcional al tiempo de exposición ni a la concentración de plomo en la sangre, por ello también debe valorarse el estado de salud médico-clínico, debido a que existe un factor de susceptibilidad individual que debe de ser considerado para el diagnóstico integral del paciente, tanto en la toxicidad como en la evaluación del riesgo (Calderón y Maldonado, 2008). Sin embargo, el presente trabajo no tiene la finalidad de relacionar Pb- δ -ALAD vs zinc, sino el análisis de los pacientes que están intoxicados de acuerdo con los índices moleculares.

8.3 Daño oxidativo y eriptosis

Los trabajadores expuestos tienen una lipoperoxidación 27% mayor que en los no expuestos, diferencia suficiente para indicar un estado patológico en la oxidación de lípidos, se sabe que el plomo a elevadas concentraciones se puede acumular en las membranas de las células con alta densidad de carga, en este caso los eritrocitos, y puede producir una reacción tipo Fenton, generando RL e iniciando el proceso de oxidación de lípidos en los ácidos grasos insaturados y poliinsaturados. En nuestros resultados se encontró una correlación baja, pero significativa entre la concentración de plomo y la lipoperoxidación ($R^2 = 0.3088$) y una mejor correlación entre la actividad de la δ -ALAD y la lipoperoxidación ($R^2 = 0.5158$), lo que indica una mayor proporción de daño oxidativo que se podría explicar porque el plomo al reducir la actividad de varias enzimas de la vía de la síntesis del grupo hemo, genera un estado en el que se incrementan las

concentraciones de hemo libre, hierro libre, ALA y protoporfirinas, lo cual junto con la hemoglobina y el oxígeno, generan condiciones de oxidación y autooxidación, con la consecuente producción de ROS ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot}) y el propio oxígeno libre (O_2) (Calderón y Maldonado, 2008; Rendón-Ramírez *et al.*, 2014). La mayor lipoperoxidación en trabajadores expuestos y las correlaciones antes mencionadas también pueden explicarse como consecuencia de que algunos componentes del sistema antioxidante, por ejemplo, las enzimas antioxidantes como catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa o bien cofactores reducidos como el glutatión, estén afectados por el plomo o bien no sea suficiente su función para contrarrestar el insulto oxidativo causado por la intoxicación con plomo (Flora *et al.*, 2012).

La eriptosis es un tipo de apoptosis que sucede en el eritrocito, este fenómeno comparte mecanismos propios de las etapas finales de la apoptosis, incluyendo la activación de proteasas, la externalización de fosfatidilserina y la formación de microvesículas apoptóticas (Quintanar y Calderón, 2006). Esta eriptosis puede ser inducida *in vitro* e *in vivo* por tóxicos asociada al daño oxidativo (Lang *et al.*, 2012), esto porque existe una mayor lipoperoxidación como lo muestran nuestros resultados, y por la alteración en el sistema de respuesta antioxidante (Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2009). El proceso eriptótico asociado al daño oxidativo ya se ha reportado en trabajadores expuestos a plomo, y se ha caracterizado en ellos por el incremento de calcio intracelular (Quintanar *et al.*, 2007), PGE_2 , activación de caspasas y externalización de fosfatidilserina (Aguilar-Dorado *et al.*, 2014). En este estudio se encontró que los trabajadores expuestos tienen 60% mayor de externalización de fosfatidilserina con respecto a los no expuestos, lo que indica que la intoxicación por plomo en estos trabajadores es una condición extrema, que permitió dar la posibilidad de detectar el incremento de la eriptosis *in vivo*. Esto es un claro reflejo de que la capacidad del sistema reticuloendotelial está sobrepasada pues los macrófagos no alcanzan a retirar a los eritrocitos dañados de circulación de manera eficiente, y prueba de ello es la gran dispersión de los datos del grupo no expuesto en los que reportamos valores para la eriptosis de cero que indicaría que para el trabajador no expuesto el sistema retículo endotelial funciona eficientemente.

El daño oxidativo es uno de los mecanismos que genera eriptosis como ya lo han propuesto Lang y colaboradores (2012), donde se incluye la apertura de canales que incrementan la entrada de Ca^{2+} , y nuestro grupo lo ha demostrado en ratas intoxicadas con plomo (Rendón-Ramírez *et al.* 2007), eritrocitos humanos incubados con plomo (Quintanar-Escorza, *et al.*, 2010) y en trabajadores expuestos a plomo (Quintanar-Escorza *et al.* 2007, Aguilar-Dorado *et al.*, 2014). El incremento de calcio intracelular principalmente se ha explicado por la disminución de GSH en trabajadores expuestos (Aguilar-Dorado *et al.*, 2014) pero también se ha asociado con el incremento de la actividad de las enzimas PLA_2 y esfingomielinasa: la PLA_2 es activada por estrés osmótico (Lang *et al.*, 2005) y nuestro equipo de trabajo ha demostrado que la intoxicación por plomo provoca estrés osmótico pues se ha encontrado *in vivo* un incremento tanto en la actividad de PLA_2 como de esfingomielinasa (Villanueva-Ibarra, 2018). La PLA_2 activada por estrés osmótico genera ácido araquidónico (AA) y un lisoderivado, lisofosfatidilcolina (LFC), integrando dos vías que culminan en la externalización de fosfatidilserina. La LFC es transformada en el factor activador de plaquetas (PAF) por acción de la enzima acetil transferasa, el PAF activa a la esfingomielinasa para generar ceramida a partir de la esfingomielina, la acumulación de ceramidas desencadena la translocación de la fosfatidilserina a la monocapa externa de la membrana. Por otro lado, el AA es transformado por la ciclooxigenasa y la PGE_2 sintasa, para obtener PGE_2 , la cual actúa sobre los receptores de PGE_2 de la membrana del eritrocito y activar a los canales de Ca^{2+} , y permitir la entrada de calcio al interior del eritrocito y desencadenar la activación de proteasas y externalización de fosfatidilserina (Lang *et al.*, 2006). Está bien reportado que varias de estas moléculas que participan en el proceso de eriptosis participan en la inflamación o procesos pro-inflamatorios como lo son el PLA_2 , el AA, la PGE_2 y las citocinas que son liberadas por los leucocitos (Porth, 2006).

La historia clínica toxicológica, los criterios de inclusión y exclusión, y la exposición/intoxicación por plomo como condición extrema es la variable que permitió delimitar las poblaciones de trabajadores, pues existen otros factores que pueden iniciar la eriptosis; el envejecimiento, infecciones, enfermedades metabólicas y estrés energético y osmótico. Para la eriptosis uno de los principales ejes es el incremento de calcio intracelular libre y se presenta en diferentes patologías entre las que se encuentran:

pacientes diabéticos (Calderón-Salinas *et al.*, 2011), insuficiencia renal (Myssina *et al.*, 2003), la anemia falciforme (Kuypers *et al.*, 1996), la deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenada (Ganesan *et al.*, 2012), enfermedades que se asocian con alteraciones renales, inmunológicas e inflamatorias (Lang, 2015).

8.4 Apoptosis de leucocitos

El proceso de eriptosis está demostrado en los trabajadores expuestos a plomo, por lo que surgió el interés de analizar el proceso de apoptosis de leucocitos, puesto que son células que también se encuentran en la circulación sanguínea. Se ha informado la exposición a plomo de leucocitos *in vitro* (Guo *et al.*, 1996) e *in vivo* en modelo animal (Farkhondeh *et al.*, 2013). Es la primera vez que se reporta *in vivo* la externalización de fosfatidilserina en leucocitos de trabajadores expuestos a plomo. Nuestros resultados muestran que los trabajadores expuestos tienen 74% mayor de externalización de fosfatidilserina respecto a los no expuestos, lo que indica también que las células leucocitarias están siendo dañadas ante las altas concentraciones de plomo en sangre, y a pesar de la gran variación de los datos en los dos grupos, existe diferencia estadística significativa por pruebas paramétricas y no paramétricas. Lo anterior confirma que los leucocitos en la circulación sanguínea también presentan un proceso de apoptosis (Elmore, 2007) ante la intoxicación por plomo, un proceso que puede ser variable respecto a los eritrocitos pues son células nucleadas, con menor tiempo de vida y de mayor tamaño lo que sugiere que sean menos susceptibles al sistema retículo endotelial para que puedan ser retirados de circulación sanguínea, además que para estas células la apoptosis es más temprana que en los eritrocitos, lo cual puede llevar a que el macrófago no tenga la habilidad para retirarlos con eficiencia.

8.5 TNF- α y estado pro-inflamatorio

Los trabajadores expuestos tienen las manifestaciones clínicas neurológicas, gastrointestinales, las deficiencias en la coordinación motora como se ha reportado en la literatura (Stoleski *et al.*, 2008; Rendón-Ramírez *et al.*, 2014). Con la historia clínica toxicológica, se logró identificar que el porcentaje de trabajadores expuestos es mayor respecto a los no expuestos, en cuanto a que presentan signos y síntomas clínicos que se asocian a la intoxicación por plomo y estados pro-inflamatorios.

Para evaluar uno de los factores del estado pro-inflamatorio, se midió la concentración de TNF- α en plasma, sin embargo, no se observó diferencia entre los trabajadores expuestos y no expuestos. Nuestro resultado se contrasta con resultados de otros autores donde reportan que en cultivos de células mononucleares de sangre periférica incubadas *in vitro* con plomo a concentraciones de 50 y 100 μM , encontraron un aumento en la secreción de IL-6 y de TNF- α , para este último hasta 1.5 veces mayor respecto a su control (Villanueva *et al.*, 2000). Un estudio informó (Di Lorenzo *et al.*, 2007) que en trabajadores de una recicladora de baterías con una media de 30.7 $\mu\text{g/dL}$ para la concentración de plomo en sangre, midieron dos citocinas en suero, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y TNF- α donde no se encontró diferencia estadística significativa para TNF- α , en cambio según Valentino y colaboradores (2007), midieron varias citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 y TNF- α) en plasma de trabajadores expuestos a plomo, trabajadores de cerámica y de una fundidora con concentraciones de plomo en sangre de 9.7 y 21.7 $\mu\text{g/dL}$ respectivamente, de esas determinaciones solo encontraron mayores concentraciones para IL-10 y para TNF- α (0.5 veces mayor). El resultado que obtuvimos podría asociarse a la adaptación en mecanismos moleculares que los trabajadores pueden desarrollar ante la intoxicación por plomo, pues las concentraciones de plomo en sangre que encontramos son más del doble en comparación a lo que han reportado otros autores y además que los trabajadores aquí estudiados están en un grado de intoxicación crónica.

La secreción de TNF- α por leucocitos está reportado que puede estimularse por la incubación de estas células con lipopolisacárido (Abbasi *et al.*, 2013), además solo se ha reportado *in vitro* en cultivos de células mononucleares de sangre periférica incubadas con plomo, que hay mayores concentraciones de TNF- α en sobrenadante al ser estimuladas con LPS (Guo *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2006). Por ello, en nuestro estudio para verificar la capacidad de producción y liberación de TNF- α , estimulamos con LPS una muestra de sangre total de los trabajadores, a la fecha no hay informes sobre ello en trabajadores intoxicados. Para trabajadores no expuestos y expuestos obtuvimos un aumento de 3.3 y 3.5 veces, respectivamente, en la concentración de TNF- α en sobrenadante en respuesta al estímulo con respecto a la concentración basal (TNF- α en plasma), pero no encontramos diferencia estadística significativa ante el estímulo en los

dos grupos, sin embargo, la dispersión de los datos de estimulación nos permitió hacer una estratificación al observar que el 75% de los trabajadores no expuestos y aproximadamente el 50% de los trabajadores expuestos, están por arriba de 20 pg/mL, por lo que tomamos este valor como punto de corte para identificar a aquellos trabajadores que presentaron menor y mayor respuesta al estímulo, pudimos apreciar que el 42% de los trabajadores mostraron menor respuesta al estímulo en comparación con los no expuestos con un 24% lo cual sugiere que los leucocitos de trabajadores tienen menor capacidad de producción y liberación de TNF- α , y que precisamente de acuerdo a la condición extrema de intoxicación por plomo de los trabajadores puede estar asociada al daño o bien a la adaptación en mecanismos moleculares que los trabajadores pueden desarrollar ante la intoxicación por plomo.

La intoxicación por plomo produce un estado clínico pro-inflamatorio, sin embargo, no se observaron cambios en la concentración del TNF- α , los resultados sugieren un estado de compensación con menor producción y secreción de TNF- α por los leucocitos en un mecanismo de “down regulation”, en la que participa el receptor para TNF- α de leucocitos y el TNF- α transmembrana, como se ha propuesto por algunos autores (Horiuchi *et al.*, 2010; Ardestani *et al.*, 2013). En tal sentido nuestros resultados sugieren que los trabajadores intoxicados por plomo pueden desarrollar adaptaciones o mecanismos moleculares de defensa, que definen la mayor o menor susceptibilidad ante el enorme insulto de daño que se genera en el organismo.

9. Conclusiones

1. La concentración de plomo en sangre en trabajadores expuestos es 25 veces mayor que en los no expuestos. También, 2 veces mayor que los valores permitidos para personal ocupacionalmente expuesto a plomo de acuerdo con la norma oficial mexicana, indicando que los trabajadores absorben grandes cantidades de plomo debido a la exposición ocupacional.
2. En los trabajadores expuestos la actividad de la enzima δ -ALAD fue 85% menor que en los no expuestos, lo que indica que la absorción de plomo condiciona una intoxicación.
3. La lipoperoxidación en eritrocitos de trabajadores expuestos es 27% mayor que en los no expuestos, lo que muestra que en la intoxicación por plomo genera estrés oxidativo en daño oxidativo a lípidos.
4. Se encontró una eriptosis 60% mayor en los trabajadores expuestos, la cual está asociado posiblemente al daño oxidativo.
5. Los trabajadores expuestos presentan externalización de fosfatidilserina en leucocitos 74% mayor que los no expuestos, indicando que estas células de la sangre también tienen mayor apoptosis ante la intoxicación por plomo.
6. Los trabajadores expuestos muestran los signos y síntomas clínicos propios de la intoxicación por plomo y de procesos pro-inflamatorios.
7. Las concentraciones de TNF- α en plasma de los trabajadores expuestos respecto a los no expuestos no hay diferencia significativa, lo que puede deberse a un proceso de defensa adaptativo.

8. En los trabajadores expuestos a plomo y en los no expuestos ante la estimulación con LPS no se encontró cambios en la concentración de TNF- α liberada por leucocitos (3.3 y 3.5 veces).
9. El 42% de los trabajadores expuestos muestran menor respuesta al estímulo en comparación con el 24% de los no expuestos, lo que indica que la intoxicación por plomo está relacionada con una menor respuesta para producir y liberar TNF- α . Sugiriendo un mecanismo de defensa adaptativa.

Conclusión general

En el presente trabajo se estudió la relación entre la intoxicación por plomo, el daño oxidativo, la eritrosis y la apoptosis de leucocitos. No se observaron cambios en la concentración del factor pro-inflamatorio TNF- α , a pesar de que los signos y síntomas clínicos característicos de la intoxicación por plomo y el estado proinflamatorio están presentes en los trabajadores expuestos a plomo; sin embargo, se identificó un grupo que tiene menor respuesta ante el estímulo para la producción y liberación de TNF- α , ello sugiere un estado de compensación en el que los leucocitos producen y secretan menos TNF- α como mecanismo de defensa, como se ha propuesto por la “down regulation” del TNF- α soluble inducida por LPS, en la que participa el receptor para TNF- α de leucocitos y el TNF- α transmembrana. Nuestros datos sugieren que los trabajadores intoxicados por plomo son capaces de desarrollar adaptaciones o mecanismos moleculares, debido a la susceptibilidad o resistencia ante el enorme insulto de daño que se genera en el organismo.

10. Perspectivas

Profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que están involucrados en la intoxicación por plomo en procesos pro-inflamatorios crónicos.

Analizar el estrés oxidativo en los leucocitos de pacientes expuestos a plomo

Indagar sobre los mecanismos que están involucrados en la apoptosis de leucocitos ante la exposición a plomo.

Estudiar las vías o procesos que están implicados en la producción, liberación y señalización de TNF- α , en leucocitos de trabajadores intoxicados con plomo.

Investigar la asociación de otras moléculas pro-inflamatorias con la intoxicación por plomo.

10. Referencias bibliográficas

- Abbasi, A., Hauth, M., Walter, M., Hudemann, J., Wank, V., Niess, A. M., Northoff, H. (2014). Exhaustive exercise modifies different gene expression profiles and pathways in LPS-stimulated and un-stimulated whole blood cultures. *Brain, Behavior, and Immunity*, 39, 130–141.
- Aguilar-Dorado, I., Hernández, G., Quintanar-Escorza, M., Maldonado-Vega, M., Rosas-Flores, M., Calderón-Salinas, J., (2014). Eryptosis in lead-exposed workers. Biochemistry Department, Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN, México DF. *Toxicology and Applied Pharmacology* 281: 195–202.
- Ardestani, S., Li, B., Desnkins, D. L., Wu, H., Massion, P. P., Young, P.P. (2008). Membrane versus soluble isoforms of TNF- α exert opposing effects on tumor growth and survival of tumor-associated myeloid cells. *73(13)*: 3938-3950.
- Berlin, A. (1974). European Standardized Method for the Determination of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity in Blood. *Z. Klin. Chem. Klin Biochem.* 12 Jg, S. 389-390.
- Burch, H., Siegel, A., (1971). Improved Method for Measurement of delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity of Human Erythrocytes. *Clinical Chemistry*, Vol. 17, No. 10: 1038-1041
- Calderón, J., Maldonado, M., (2008). Contaminación e Intoxicación por Plomo. Trillas. México
- Calderón-Salinas, J. V., Muñoz-Reyes, E. G., Guerrero-Romero, J. F., Rodríguez-Morán, M., Bracho-Riquelme, R. L., Carrera-Gracia, M. A., & Quintanar-Escorza, M. A. (2011). Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 357(1–2), 171–179
- Calderón-Salinas, J. V., Quintanar-Escorza, M. A., González-Martínez, M. T., Hernández-Luna, C. E. (1999). Lead and calcium transport in human erythrocyte. *Human & Experiment Toxicology* 18, 327-332.
- Cheng, Y. J., Chang, B. C., Liu, M. Y. (2006). Lead increases lipopolysaccharide-induced liver injury through tumor necrosis factor- α overexpression by monocytes/macrophages: Role of protein kinase C and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Environmental Health Perspectives*, 114(4), 507–513
- Corti, A., Poesi, C., Merli, S., Cassani, C. (1994). Tumor necrosis factor (TNF) α quantification by ELISA and bioassay: effects of TNF α -soluble TNF receptor (p55) complex dissociation during assay incubations. *Journal of Immunological Methods* 177, 191-198
- Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q., Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 14(3–4), 193–209.
- Di Lorenzo, L., Silvestroni, A., Martino, M. G., Gagliardi, T., Corfiati, M., Soleo, L. (2006). Evaluation of peripheral blood neutrophil leucocytes in lead-exposed workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 79(6), 491–498.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.

- Ernst, J. D., Mall, A., Chew, G. (1994). Annexins possess functionally distinguishable Ca²⁺ and phospholipid binding domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Farkhondeh, T., Boskabady, M., Koohi, M., Sadeghi-Hashjin, G., Moin, M. (2013). The Effect of Lead Exposure on Selected Blood Inflammatory Biomarkers in Guinea pigs. *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*, 13(1), 45–49.
- Finelli, V. (1977). Lead, zinc and 5-aminolevulinatase En The ALA-D Activity Test in Lead-Exposed Grey Mullet *Mugil auratus*. *Marine Ecology – Progress Series Vol. 3*: 187-191.
- Flora, G., Gupta, D., Tiwari, A., (2012). Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip Toxicol. Vol. 5(2)*: 47–58
- Fujita, H., Ishihara, N., (1988). Reduction of δ -aminolevulinatase concentration by bromobenzene in rats. *British Journal of Industrial Medicine*, 45:640-644.
- Fujita, H., Orii, Y., Sano, S., (1981). Evidence of increased synthesis of δ -aminolevulinic acid dehydratase in experimental lead-poisoned rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 678:39-50.
- Ganesan, S., Chaurasiya, N. D., Sahu, R., Walker, L. A., Tekwani, B. L. (2012). Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: Evaluation of eryptotic pathway. *Toxicology*, 294(1), 54–60.
- Gillis, B. S., Arbieva, Z., Gavin, I. M. (2012) Analysis of lead toxicity in human cells. *BMC Genomics*, 13:344
- Gottesfeld, P., & Pokhrel, A. K. (2011). Review: Lead exposure in battery manufacturing and recycling in developing countries and among children in nearby communities. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 8(9), 520–532.
- Guo, T. L., Mudzinski, S. P., Lawrence, D. A. (1996). The heavy human metal lead modulates receptors the expression cells and TNF- α in lipopolysaccharide-activated human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 59(6), 932–939.
- Gutiérrez-Salinas, J., García-Ortiz, L., Chima-Galán, M., Suástegui-Domínguez, S., Rivera-Badillo, M., Cruz-Tovar, L. (2009). Determinación de la concentración de malondialdehído y la actividad de enzimas antioxidantes en eritrocitos contenidos en bolsas para transfusión sanguínea. *Rev Mex Patol Clin*, Vol. 56, Núm. 4, pp. 223-234.
- Hermle, T., Shumilina, E., Attanasio, P., Akel, A., Kempe, D., Lang, P., Podolski, M., Gatz, S., Bachmann, R., Bachmann, C., Abele, H., Huber, S., Wieder, T., Lang, F. (2006). Decreased cation channel activity and blunted channel-dependent eryptosis in neonatal erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 291: C710-C717
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H., Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- α : Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, 49(7), 1215–1228.
- Jain, S., McVie, R., Duett, J., Herbst, J. (1989). Erythrocyte Membrane Lipid Peroxidation and Glycosylated Hemoglobin in Diabetes. *Diabetes* 38:1539-1543.

- Jain, S., Ross, J., Levy, G., Duett, J. (1990). The Effect of Malonyldialdehyde on Viscosity of Normal and Sickle Red Blood Cells. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 44, 37-41.
- Krajnovit-Ozretik, M., Ozretik, B., (1980). The ALA-D Activity Test in Lead-Exposed Grey Mullet Mugil auratus. *Marine Ecology – Progress Series Vol. 3: 187-191.*
- Kuypers, F. A., Lewis, R. A., Hua, M., Schott, M. A., Discher, D., Ernst, J. D., Lubin, B. H. (1996). Detection of Altered Membrane Phospholipid Asymmetry in Subpopulations of Human Red Blood Cells Using Fluorescently Labeled Annexin V. *Blood*, 87(3), 1179–1187.
- Lang, E., Lang, F. (2015). Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 39, 35–42.
- Lang, E., Qadri, S. M., Lang, F. (2012). Killing me softly - Suicidal erythrocyte death. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(8), 1236–1243.
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Myssina, S., Tanneur, V., Birka, C., Laufer, S., ... Huber, S. M. (2005). PGE₂ in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death and Differentiation*, 12(5), 415–428.
- Levin, S. M., Goldberg, M. (2000). Clinical evaluation and management of lead-exposed construction workers. *American Journal of industrial Medicine*, 37(37), 23–4323.
- Lorenzo, L. D. I., Vacca, A., Corfiati, M., Lovreglio, P., Soleo, L. (2007). Colony-Stimulating Factor Serum Levels in Lead-Exposed Smoker Workers, 20(2), 239–247.
- Myssina, S., Huber, S. M., Birka, C., Lang, P. A., Lang, K. S., Friedrich, B., ... Lang, F. (2003). Inhibition of Erythrocyte Cation Channels by Erythropoietin. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(11), 2750–2757.
- Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA1-2013, Salud ambiental. Limitaciones y especificaciones sanitarias para el uso de los compuestos de plomo.
- Norma Oficial Mexicana NOM-199-SSA1-2000. Salud ambiental. Niveles de plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente.
- OMS. (2016) Intoxicación por plomo y salud. Nota descriptiva. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/es/>
- Perdomo-Celis, F., Salgado, D.M., Narváez, C.F. (2016). Levels of Circulating Tumor Necrosis Factor- α in Children with Symptomatic Dengue Evaluated by ELISA and Bead-Based Assays. *Viral Immunology*. Volume 00, Number 00.
- Portal de Estadística, Statista.com (2017). Disponible en: <https://es.statista.com/estadisticas/635363/paises-lideres-en-la-produccion-de-plomo-a-nivel-mundial/>
- Porth, C. (2006). Fisiopatología, Salud-enfermedad: un enfoque conceptual. Medica Panamericana, 7^a edición. México.
- Quintanar, M., Calderón, J. (2006). Eriptosis, la Apoptosis del Eritrocito. *REB* 25(3):85-89.
- Quintanar-Escorza, M. A., González-Martínez, M. T., del Pilar, I. O. M., Calderón-Salinas, J. V. (2010). Oxidative damage increases intracellular free calcium [Ca²⁺];

- concentration in human erythrocytes incubated with lead. *Toxicology in Vitro*, 24(5), 1338–1346.
- Quintanar-Escorza, M. A., González-Martínez, M. T., Navarro, L., Maldonado, M., Arévalo, B., Calderón-Salinas, J.V. (2007) Intracellular free calcium concentration and calcium transport in human erythrocytes of lead-exposed workers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 220: 1–8.
 - Redig, P., Lawler, E., Schwartz, S., Dunnette, J., Stephenson, B., Duke, G. (1991). Effects of Chronic Exposure to Sublethal Concentrations of Lead Acetate on Heme Synthesis and Immune Function in Red-Tailed Hawks. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 72-77
 - Rendón-Ramírez, A., Cerbón-Solórzano, J., Maldonado-Vega, M., Quintanar-Escorza, M., Calderón-Salinas, J. (2007). Vitamin-E reduces the oxidative damage on δ -aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *Toxicology in Vitro* 21:1121-1126.
 - Rendón-Ramírez, A., Maldonado-Vega, M., Quintanar-Escorza, M., Hernández, G., Arévalo-Rivas, B., Zentella-Dehesa, A., Calderón-Salinas, J. (2014). Effect of vitamin E and C supplementation on oxidative damage and total antioxidant capacity in lead-exposed workers. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37:45–54
 - Santos, J. L., Fontanellas, A., Batlle, A. M. C., Enríquez de Salamanca, R. (1998) Reference values of 5-aminolevulinic dehydrase and porphobilinogen deaminase in the spanish population from Madrid. *Ecotoxicology and environmental safety, Environmental Research, Section B* 39, 168-171.
 - Stoleski, S., Karadžinska-Bislimovska, J., Stikova, E., Risteska-kuc, S., Mijakoski, D., Minov, J. (2008). Adverse Effects in Workers Exposed to Inorganic Lead. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 59(1), 19–29.
 - Stoleski, S., Karadžinska-Bislimovska, J., Stikova, E., Risteska-kuc, S., Mijakoski, D., Minov, J. (2008). Adverse Effects in Workers Exposed to Inorganic Lead. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 59(1), 19–29.
 - Tortora, G., Derrickson, B., (2006). *Principios de Anatomía y Fisiología*. Medica Panamericana, 11ª edición. México
 - Valentino, M., Rapisarda, V., Santarelli, L., Bracci, M., Scorcelletti, M., Di Lorenzo, L., ... Soleo, L. (2007). Effect of lead on the levels of some immunoregulatory cytokines in occupationally exposed workers. *Human & Experimental Toxicology*, 26(7), 551–556.
 - Villaneuva, M. B. G., Koizumi, S., Jonai, H. (2000). Cytokine Production by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells after Exposure to Heavy Metals. *Journal of Health Science*, 46(5), 358–362.
 - Villanueva-Ibarra, C. A. (2018). Fosfolipasa A₂ y esfingomielinasa como mecanismos moleculares involucrados en la inducción de eritrosis en trabajadores expuestos a plomo. Tesis de Maestría. Departamento de Bioquímica. CINVESTAV.