

**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“La exposición a bajas concentraciones de plomo afecta la función de los
macrófagos inflamatorios y anti-inflamatorios derivados de médula ósea de
ratón”**

Tesis que presenta:

M. en C. Christian Daniela Ortiz Robles

para obtener el Grado de Doctora en Ciencias
en la Especialidad de Toxicología

Directora de tesis:

Emma Soraida Calderón Aranda

Ciudad de México

Octubre, 2021

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunotoxicología y Mecanismos Moleculares de Toxicidad del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Emma S. Calderón Aranda con el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca con No. de registro (CVU) 631392 y de los proyectos No. 152491 y 32913.

DEDICATORIAS

A mi sobrino Hugo † y a mi hermana Cuquita por ser las personas que me impulsaron a llegar hasta aquí. Les agradezco infinitamente su amor, comprensión, apoyo y fuerzas para seguir luchando por ser una persona mejor.

Hugo †:

Nunca olvidaré que siempre decías que “arriba de las nubes siempre sale el sol” porque es lo que me mantendrá con ganas de seguir recorriendo este camino, llamado vida, hasta que nos volvamos a encontrar.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Emma por la confianza otorgada ya que a pesar de no haber sido su estudiante de maestría me abrió las puertas de su laboratorio. Le agradezco su apoyo brindado en la toma de decisiones y sobre todo que estuviera presente en los momentos familiares y personales difíciles en donde siempre me demostró que es una persona con una calidad humana enorme.

A mi comité académico: Dra. Betza, Dra. Libia, Dra. Miriam y Dr. Vianney por sus aportaciones y sugerencias valiosas en el desarrollo experimental de la tesis y en la escritura del artículo.

A mis compañeros del laboratorio 13: Beto y Lili por compartirme de sus conocimientos. Vanessa por el apoyo enorme en la realización de los experimentos y su amistad. Omar por su compañerismo, apoyo y amistad tan grande.

A mi familia CINVESTAV: Elvira, Arturo, Andrés, Sandra, Sol, Yadira y Anita por esas risas que hacían olvidar que todo iba mal antes de los avances, por su amistad y apoyo brindados durante estos 7 años juntos.

A mis amigos: Ramsés, Carlos, Rosa, Quetzal y Nere por su apoyo, cariño y amistad infinita.

A mi familia: Carlota, papás, hermanos y sobrinos por todo el amor y el esfuerzo que siempre han hecho para que yo llegue tan lejos y vuele tan alto como sea posible.

A CINVESTAV por abrirme sus puertas y a sus miembros que siempre estuvieron dispuestos a brindarme apoyo desde el día en que ingrese a la institución.

A Dios por hacerme cada día más fuerte ya que a pesar de las tempestades siempre ha estado presente para mantenerme de pie y por recordarme a diario que sus tiempos y planes son perfectos y mejores que los míos.

RESUMEN

El plomo (Pb) es un metal tóxico ubicuo que disminuye la resistencia a las infecciones, en las que los macrófagos tienen un papel esencial. Se han reportado efectos adversos del Pb sobre la producción de óxido nítrico (NO^*) y efectos variables sobre la producción de citocinas inflamatorias en macrófagos activados, pero no se ha reportado ningún efecto en macrófagos anti-inflamatorios. En este trabajo evaluamos los efectos del Pb (0.03 - 6 $\mu\text{g}/\text{dL}$, equivalente a 0.014 - 2.89 μM) sobre la función de macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM) de ratón BALB/c inducidos a los fenotipos inflamatorio o anti-inflamatorio con Lipopolisacárido (LPS) + Interferón (IFN) γ o interleucina (IL)-4 + IL-13, respectivamente, y si estos efectos están relacionados entre sí. El Pb no indujo citotoxicidad a ninguna concentración en ambos fenotipos de macrófagos. En los BMDM inflamatorios, el Pb (6 $\mu\text{g}/\text{dL}$) inhibió la producción de óxido nítrico (NO^*) sin afectar los niveles de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) ni la actividad basal de la arginasa (Arg) 1. La exposición a Pb aumentó la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC) II en la membrana a 3 y 6 $\mu\text{g}/\text{dL}$, pero no modificó la expresión de la molécula co-estimuladora CD86, ni la producción y secreción del Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α o IL-1 β , lo que sugiere que el Pb no afecta la vía completa de activación inflamatoria en los BMDM. En los BMDM anti-inflamatorios, el Pb no alteró la actividad de la Arg 1, pero a 3 y 6 $\mu\text{g}/\text{dL}$ aumentó la expresión del Factor de Crecimiento Transformante (TGF)- β 1 y del receptor de manosa (CD206), sugiriendo también que el Pb no afecta la vía completa de activación anti-inflamatoria. Los resultados mostraron, por primera vez, que concentraciones ambientalmente relevantes de Pb alteran parámetros funcionales o marcadores fenotípicos de anti-inflamación. Los efectos del Pb sobre los macrófagos inflamatorios no dependen de la retroalimentación negativa resultante del efecto del Pb sobre el fenotipo anti-inflamatorio. El Pb afectó sólo a algunas moléculas o vías específicas relacionadas con ambos fenotipos. Estos efectos podrían estar relacionados con los efectos del Pb sobre la defensa inmunitaria contra los patógenos intracelulares y la susceptibilidad a presentar alergias.

ABSTRACT

Lead (Pb) is a ubiquitous toxic metal that decreases resistance to infections, in which the macrophages have an essential role. Pb adverse effects on nitric oxide (NO[•]) production and variable effects on inflammatory cytokines production in activated macrophages have been reported, but no effects have been reported in anti-inflammatory macrophages. We studied Pb (0.03 - 6 µg/dL equivalent to 0.014 - 2.89 µM) effects on the function of bone marrow-derived macrophages (BMDM) from BALB/c mouse induced to either inflammatory or anti-inflammatory phenotypes, with lipopolysaccharide (LPS) + Interferon (IFN)_γ or (interleukin) (IL)-4 + IL-13, respectively, and whether these effects are related to each other. Pb did not induce cytotoxicity at any concentration in both macrophage phenotypes. In inflammatory BMDM, Pb (6 µg/dL) inhibited nitric oxide (NO[•]) production without affecting inducible nitric oxide synthase (iNOS) levels or basal arginase (Arg) 1 activity. At 3 and 6 µg/dl, Pb enhanced the major histocompatibility complex class II (MHC II) membrane expression but did not modify the CD86 costimulatory molecule expression, Tumoral Necrosis Factor (TNF)-α, or IL-1β production and secretion, suggesting that Pb does not affect the whole inflammatory activation pathway in BMDMs. In anti-inflammatory BMDM, Pb did not alter Arg 1 activity, but at 3 and 6 µg/dL, increased Transforming Growth Factor (TGF)-β1 and mannose receptor (CD206) expression, also suggesting that Pb does not affect the whole anti-inflammatory activation pathway. Results showed that environmentally relevant concentrations of Pb alter functional outcomes or phenotypic markers of anti-inflammatory for the first time. The Pb effects on the inflammatory macrophages are not dependent on negative feedback resulting from the Pb effect on the anti-inflammatory phenotype. The Pb affected only some molecules or specific pathways related to both phenotypes. These effects could be related to Pb effects on immune defense against intracellular pathogens and allergy susceptibility.

INDICE

	Página
1	Introducción..... 1
1.1	Plomo 1
1.1.1	Fuentes de Pb 1
1.1.2	Toxicocinética del Pb..... 2
1.1.3	Mecanismos moleculares de toxicidad del Pb 3
1.1.4	Toxicidad del Pb 4
1.2	Sistema inmune 10
1.2.1	Macrófagos 11
1.2.2	Macrófagos inflamatorios..... 11
1.2.3	Mediadores de la función inflamatoria del macrófago..... 12
1.2.3.1	NO [•] 12
1.2.3.2	Citocina TNF- α 12
1.2.3.3	Citocina IL-1 β 13
1.2.3.4	Receptor CD86 13
1.2.3.5	Complejo principal de histocompatibilidad II (MHC II) 13
1.2.4	Macrófagos anti-inflamatorios..... 14
1.2.5	Mediadores de la función anti-inflamatoria del macrófago..... 14
1.2.5.1	Actividad de Arg 1..... 14
1.2.5.2	Receptor de manosa CD206 15
1.2.5.3	Factor de crecimiento transformante (TGF)- β 15
1.3	Justificación 17
1.4	Hipótesis..... 18
1.5	Objetivos..... 18
1.5.1	Objetivo general..... 18
1.5.2	Objetivos particulares 18
2	Métodos 19
2.1	Reactivos..... 19
2.2	Estrategia experimental 20
2.3	Características de los nimaes 20
2.4	Cultivos celulares..... 21

2.4.1	Células de medula ósea de ratón	21
2.4.2	Aislamiento, diferenciación y cultivo de las células de medula ósea	21
2.5	Tratamientos.....	22
2.6	Determinación de la viabilidad celular por el método de la reducción de la sal de formazán (MTT).....	23
2.7	Determinación del NO [•] por el método de Griess	24
2.8	Determinación de la actividad de la enzima Arg.....	24
2.9	Determinación de interleucinas por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	25
2.10	Determinación de marcadores fenotípicos por citometría de flujo	26
2.11	Análisis estadístico	30
3	Resultados	31
3.1	El Pb no afectó la viabilidad en los BMDM inflamatorios o anti-inflamatorio	31
3.2	El Pb disminuyó la producción de NO [•] en los BMDM inflamatorio sin afectarla en los anti-inflamatorios	32
3.3	El Pb no afectó los niveles proteicos de iNOS en los BMDM inflamatorios	33
3.4	El Pb no afectó la actividad de la Arg 1 en los BMDM inflamatorios y anti-inflamatorios.....	34
3.5	El Pb no afectó la producción ni secreción de TNF- α en los BMDM estimulados al fenotipo inflamatorio.....	35
3.6	El Pb no afectó la producción ni secreción de IL-1 β en los BMDM estimulados al fenotipo inflamatorio.....	35
3.7	El Pb aumentó la expresión de moléculas de MHC II (I-A/I-E), sin aumentar CD86 en los BMDM inflamatorios y sin afectar la expresión de ambos marcadores en el fenotipo anti-inflamatorio	38
3.8	El Pb aumentó la expresión de moléculas de TGF β 1 y receptor de manosa (CD206) en los BMDM estimulados al fenotipo anti-inflamatorio sin afectarla en el fenotipo inflamatorio	38
4	DISCUSION	43
5	CONCLUSIONES.....	51
6	PERSPECTIVAS.....	52
7	REFERENCIAS.....	53
8	ANEXOS	63

8.1	Hoja de seguridad del Pb	63
8.2	Articulo científico producto de esta tesis.....	71

.

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Alteraciones inmunes relacionadas con exposición a Pb en poblaciones	6
Tabla 2. Efecto de la exposición a Pb sobre indicadores de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T y B.....	6
Tabla 3. Efecto del Pb en macrófagos	8
Tabla 4. La exposición a Pb disminuye la respuesta inmune contra patógenos.....	9
Tabla 5. Anticuerpos usados en citometría de flujo para determinar la expresión de marcadores fenotípicos	28

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Esquematación del efecto del Pb en los linfocitos T y B.....	7
Figura 2. Células implicadas en la respuesta inmune.	10
Figura 3. Esquematación de los efectos descritos del Pb sobre linfocitos (T y B) y macrófagos y las interacciones entre estos.	17
Figura 4. Estrategia experimental realizada en macrófagos derivados de medula ósea de ratón BALB/c (BMDM).....	20
Figura 5. Estrategia de selección celular para identificar las subpoblaciones de los BMDM inducidos con estímulos inflamatorio y anti-inflamatorio para analizar la expresión de marcadores fenotípicos.	29
Figura 6. El Pb no afectó la viabilidad en los BMDM inflamatorios o anti-inflamatorio a las 72 h.	31
Figura 7. El Pb disminuyó la producción de NO•- en los BMDM inflamatorio sin afectarla en los anti-inflamatorios a las 72 h.....	32
Figura 8. El Pb no afectó los niveles proteicos de iNOS en los BMDM inflamatorios a las 72 h.....	33
Figura 9. El Pb no afectó la actividad de la Arg 1 en los BMDM inflamatorios y anti-inflamatorios a las 72 h.....	34
Figura 10. El Pb no afectó la producción ni secreción de TNF- α en los BMDM estimulados al fenotipo inflamatorio a las 72 h.....	36
Figura 11. El Pb no afectó la producción ni secreción de IL-1 β en los BMDM estimulados al fenotipo inflamatorio a las 72 h.....	37
Figura 13. El Pb no alteró la expresión de CD86 en los BMDM estimulados a los fenotipos inflamatorio o anti-inflamatorio a las 72 h.	40
Figura 14. El Pb aumentó la expresión de moléculas de TGF β 1 en los BMDM estimulados al fenotipo anti-inflamatorio sin afectarla en el fenotipo inflamatorio a las 72 h.	41
Figura 15. El Pb aumentó la expresión de moléculas de TGF β 1 y receptor de manosa (CD206) en los BMDM estimulados al fenotipo anti-inflamatorio sin afectarla en el fenotipo inflamatorio a las 72 h.	42

Figura 16. Alteraciones inducidas por el Pb en mediadores funcionales de macrófagos inflamatorios y anti-inflamatorios. 50

Abreviaturas

ALA-D	Ácido δ -aminolevulínico dehidrasa
ALA-S	Ácido δ -aminolevulínico sintasa
Arg	Arginasa
BMDM	Macrófagos derivados de medula ósea
CAT	Catalasa
CDC	Centros para el Control y la prevención de Enfermedades
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMT	Transportadores de metales divalentes
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IFN γ	Interferón γ
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LAP	Proteína asociada a latencia
L-Arg	L-Arginina
LPS	Lipopolisacárido
LTBP	TGF β latente
LLC	Complejo latente grande
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad II
mTNF- α	Factor de necrosis tumoral α membranal
MTT	Bromuro de 3-(4,5-Dimitiltiazol-2-yl)-2,5-Difenitetrazolio
NF- κ B	Factor Nuclear κ B
NO \bullet	Óxido nítrico
O ₂ \bullet^-	Ion superóxido
Pb	Plomo
PbS	Plomo en sangre

PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SLC	Complejo latente pequeño
SOD	Superóxido dismutasa
STAT	Transductor de señal y activador de transcripción
sTNF- α	Factor de necrosis tumoral α soluble
TCR	Receptor de antígenos de las células T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TLRs	Receptores Tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α

1 Introducción

1.1 Plomo

El plomo (Pb) es un elemento metálico, con número atómico 82, masa atómica 207.2 g/mol y valencia de 2⁺ ó 4⁺. Este elemento se caracteriza por ser de color gris azulado, brillante, suave, maleable, dúctil, poco conductor de la electricidad y resistente a la corrosión. La composición isotópica del Pb es la siguiente: ²⁰⁴Pb (1.4%), ²⁰⁶Pb (25.2%), ²⁰⁷Pb (21.7%) y ²⁰⁸Pb (51.7%). El Pb raramente se encuentra naturalmente como un metal puro, ya que por lo general se combina con dos o más elementos formando aleaciones metálicas (ATSDR, 2007).

1.1.1 Fuentes de Pb

Entre las fuentes naturales de Pb se encuentra la actividad volcánica, el desgaste de rocas y el depósito de Pb en el suelo, los sedimentos y el agua de las áreas mineras (IARC, 2006). El Pb se encuentra en la corteza terrestre en niveles bajos, principalmente como galena. Debido a sus características físicas y químicas, el Pb y sus compuestos se han utilizado en una amplia variedad de productos como: pinturas, cerámica, tuberías, materiales de plomería, soldaduras, gasolina, baterías, municiones y cosméticos (EPA, 2017). Las fuentes habituales de exposición a Pb son el agua y los alimentos contaminados. La presencia de Pb en agua se debe principalmente a los sistemas de distribución que contienen Pb en tuberías, soldaduras y accesorios. La contaminación de los alimentos como vegetales y cereales se debe al Pb presente en el suelo de cultivo cercano a minas o industria minero-metalúrgica en general, los utensilios de cocina (loza de barro vidriada), o en el caso de los alimentos enlatados en los que anteriormente se utilizaba la soldadura de Pb. Gran parte de la exposición a Pb proviene de las actividades humanas incluyendo el uso de combustibles fósiles, algunos tipos de instalaciones industriales, el reciclaje informal de baterías y el uso en los hogares de pinturas a base de Pb (WHO, 2019).

1.1.2 Toxicocinética del Pb

La exposición a Pb es principalmente por ingestión e inhalación; esta última ruta es la forma más común de ingreso del Pb en las poblaciones con exposición laboral. En la exposición inhalatoria, el tamaño de partícula es muy importante, ya que a menor tamaño de partícula ($<1\mu\text{M}$) aumenta la dosis inhalada. La cantidad de Pb absorbida por el tracto gastrointestinal puede llegar hasta el 40% de la concentración ingerida, dependiendo en gran medida de la edad (en niños la tasa de absorción es mayor) y la forma de alimentación del individuo, ya que la dieta con bajo contenido de zinc, magnesio, hierro y calcio, aumentan la absorción de Pb. La vía dérmica es otra forma de ingreso al organismo, principalmente de los compuestos orgánicos de Pb (Committee on Measuring Lead in Critical Populations, 1993). El Pb ingresa a las células mimetizando al Fe^{2+} , a través de los transportadores de metales divalentes (DMT)¹. Éste es en un sistema uniporte con un gradiente de protones manejado por la fuerza del transportador (Ballatori, 2002; Nevo & Nelson, 2006).

Después de su ingreso al organismo, del 95 al 99% de Pb se une a los eritrocitos (con una vida media ($t_{1/2}$) de 30 – 35 días), y el resto se une a las proteínas de plasma, lo que facilita su distribución por el torrente sanguíneo a los tejidos del cuerpo, incluyendo corazón, hígado, riñones, yeyuno y glándulas tiroidea y adrenal, en donde tiene una $t_{1/2}$ de 4 a 6 semanas (Sanin et al., 1998). El Pb inorgánico no se metaboliza. Sin embargo, los compuestos orgánicos, prácticamente en desuso a partir de su eliminación de las gasolinas, tetraetilo y tetrametilo de Pb concentrados en el hígado se metabolizan a trietilo y trimetilo, respectivamente, por procesos de desalquilación oxidativa por acción de las enzimas del citocromo P450 (CYP450) (ATSDR, 2007). El 90% de la carga total de Pb en el cuerpo se almacena en tejido óseo y dientes con una $t_{1/2}$ de 20 a 30 años. La eliminación del Pb ocurre principalmente por la orina (75 – 80%) y las heces ($< 20\%$), aunque también se puede eliminar una pequeña cantidad ($< 5\%$) por el sudor, el cabello y las uñas (Committee on Measuring Lead in Critical Populations, 1993).

1.1.3 Mecanismos moleculares de toxicidad del Pb

El Pb tiene la capacidad de generar daño celular, principalmente por su habilidad para sustituir a cationes divalentes y por el desbalance que se genera entre la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y la disminución de antioxidantes. El desplazamiento iónico de metales divalentes como el Ca^{2+} y el Zn^{2+} por el Pb, se debe a su radio iónico y electronegatividad mayores, lo que permite interacciones favorables con los grupos coordinados y a su vez una fácil unión al sitio activo de las biomoléculas. El Pb también puede unirse a sitios diferentes al sitio activo de las proteínas, modificando la estructura de las moléculas, ya que es capaz de unirse a grupos funcionales capaces de donar electrones (tiol, carboxilo o carbonilo) (Eichhorn, 1976). El azufre actúa como el ligando principal en el caso del desplazamiento de Zn^{2+} , ya que el Pb forma enlaces coordinados con un menor número de ligandos (3 residuos de cisteína) formando una geometría piramidal trigonal distorsionada en comparación al Zn^{2+} (4 residuos de cisteína), esto debido al número de coordinación diferente en ambos elementos (Kirberger & Yang, 2008). El oxígeno (presente en grupos carboxilo o carbonilo) es por excelencia el ligando de unión con el Ca^{2+} , el que puede ser sustituido por Pb (Garza *et al.*, 2006).

Por otra parte, la sustitución del Ca^{2+} por el Pb puede modificar la homeostasis y la función del Ca^{2+} en tres formas: 1) la competencia de Pb y Ca^{2+} por los sistemas de transporte (los canales y bomba de Ca^{2+}), 2) la alteración de la homeostasis intracelular de Ca^{2+} , y 3) la unión del Pb a proteínas efectoras como calmodulina, proteína cinasa C, canales dependientes de Ca^{2+} , proteínas en la membrana plasmática y la liberación de neurotransmisores (Simons, 1993). Cuando el Pb ocupa sitios de unión al Zn^{2+} se interrumpen las funciones estructurales y catalíticas de diversas biomoléculas. Entre estas están las enzimas necesarias para sintetizar el grupo hemo (ácido aminolevulínico sintasa (ALA-S), δ -aminolevulínico dehidrasa (ALA-D) y ferroquelatasa), del sistema antioxidante (superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa (GPx)), y la alteración estructural de proteínas como las

protaminas y factores de transcripción con estructura de dedos de Zn (como TFIIIA y GATA) (Ghering *et al.*, 2005; Hanas *et al.*, 1999; Jan *et al.*, 2015).

El estrés oxidante originado por el Pb puede llevarse a cabo por una serie de reacciones en cadena que generan ROS como el ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Las ROS son producidas principalmente por la auto-oxidación del ALA, la oxidación de la oxihemoglobina a metahemoglobina y la lipoperoxidación de membranas celulares por efecto del Fe^{2+} que no se unió a la protoporfirina al inhibir a la ferroquelatasa (Ahamed & Siddiqui, 2007). Por otra parte, el Pb disminuye las reservas antioxidantes capaces de secuestrar las ROS y los iones de Pb. Tal disminución ocurre principalmente por la alteración en los niveles de antioxidantes como el glutatión (GSH) y las enzimas SOD y CAT. El GSH se afecta por la unión covalente del Pb con los grupos sulfhidrilo (SH) de esta molécula y los de las enzimas GR y GPx, importantes en su biotransformación. Las enzimas SOD y CAT se inhiben por la unión del Pb a sus sitios catalíticos (Carocci *et al.*, 2014).

1.1.4 Toxicidad del Pb

La toxicidad del Pb depende en gran medida de las características del individuo (edad, género y hábitos), siendo los niños más susceptibles al daño (Liu *et al.*, 2013). Por lo anterior, los Centros de Control de Enfermedades (CDC), establece que concentraciones $\geq 5 \mu\text{g/dL}$ de Pb en sangre (PbS) son un indicador de la necesidad de intervención clínica en la población infantil (CDC, 2021). En nuestro país, la Norma Oficial Mexicana de Salud Ambiental NOM-199-SSA1-2000 se modificó en el año 2017 disminuyendo el límite de intervención, de 10 a $5 \mu\text{g/dL}$ de PbS, en niños < 15 años, mujeres embarazadas y en periodo de lactancia. Sin embargo, los niveles de intervención en el resto de la población no expuesta ocupacionalmente se mantienen en $\geq 25 \mu\text{g/dL}$ de Pb (SEGOB, 2017). En población expuesta laboralmente a Pb la norma (NOM-047-SSA1-2011) establece un índice biológico de exposición de $10 \mu\text{g/dL}$ de PbS en mujeres en periodo fértil y de $30 \mu\text{g/dL}$ de PbS en hombres (SEGOB, 2021).

A dosis elevadas de exposición a Pb, las alteraciones más evaluadas son a nivel del sistema nervioso y hasta el momento se desconoce una concentración segura de PbS para evitar los efectos neurotóxicos. Sin embargo, los efectos tóxicos generados por el Pb ocurren a nivel de los diversos órganos y sistemas, incluyendo el hematopoyético y el inmune. En el sistema hematopoyético, el síntoma más frecuente de toxicidad es la anemia que se produce por la inhibición de la síntesis del grupo hemo y la acelerada destrucción de los eritrocitos por macrófagos debido a la exposición de fosfatidilserina en la membrana y la generación de microvesículas en los eritrocitos (Jang *et al.*, 2011).

En poblaciones humanas, la exposición a Pb se ha asociado con una mayor incidencia de enfermedades autoinmunes e hipersensibilidad, sugiriendo que la exposición a Pb produce la desregulación o supresión de los mecanismos efectores de los diferentes componentes celulares del sistema inmune (Tabla 1).

Se ha reportado que el Pb disminuye la inmunidad adaptativa; inhibe la proliferación de células T y disminuye la respuesta tipo Th1 (disminución de Interferón (IFN) γ), generando una supresión de la respuesta de hipersensibilidad tardía, estimula la respuesta tipo Th2 (incremento de interleucina (IL)-4 e IL-10) (Tabla 2); esto propiciaría la maduración de los linfocitos B y el cambio de isotipo de la inmunoglobulina IgG hacia IgE (Figura 1) (Dietert & Piepenbrink, 2006). Se sugiere que estos efectos en las células inmunes repercuten en la alteración de la función de diferentes subtipos celulares de la respuesta inmune, incluyendo a los macrófagos.

Tabla 1. Alteraciones inmunes relacionadas con exposición a Pb en poblaciones

Modelo de estudio	[Pb en sangre]	Resultado	Referencia
Población infantil (China)	5.2 – 8.8 µg/dL	Individuos con elevados niveles de PbS y alergias tuvieron mayores niveles de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) y bajos niveles de citocinas Th1 (IFN γ e IL-12) con respecto a los individuos sanos	Hsiao <i>et al.</i> , 2011
Población infantil (Taiwan)	1.86 µg/dL	Asociación positiva entre el Pb y la incidencia de asma. PbS se asoció con IgE en suero ($\beta=0.26$).	Wang <i>et al.</i> , 2017

Tabla 2. Efecto de la exposición a Pb sobre indicadores de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T y B

Modelo de estudio	[Pb en sangre]	Resultado	Referencia
Células CD4⁺ de ratón	1 µg/dL	Inhibición de la producción de IFN γ por Th1 e incremento de IL-4 por Th2	Heo <i>et al.</i> , 1998
Población infantil expuesta ambientalmente (Estados Unidos)	> 15 µg/dL	Correlación de PbS con el incremento en linfocitos B y anticuerpos IgA, IgG e IgM.	Sarasua <i>et al.</i> , 2000
Población expuesta laboralmente (Korea)	10 – 30 µg/dL	Asociación positiva de IgE en suero con PbS ($\beta=0.00089$; $p=0.036$)	Heo <i>et al.</i> , 2004
Población infantil expuesta ambientalmente (China)	$\bar{x} = 95.2$ µg/dL	Correlación negativa de CD4 ⁺ en sangre con PbS ($r=-0.462$; $p<0.05$)	Li <i>et al.</i> , 2005
Células mononucleadas de sangre de humano	0.0015– 0.005 µg/dL	Bajos niveles de IFN, IL-1 y TNF- α Altos niveles de IL-4 e IL-10	Hemdan <i>et al.</i> , 2005
Población expuesta laboralmente (España)	-	Disminución de CD3 ⁺ , TNF- α , IFN γ e incremento de IL-10 en comparación con el grupo control	García-Lestón <i>et al.</i> , 2012
Población expuesta laboralmente (Polonia)	15.1 – 55.6 µg/dL	Niveles alterados de citocinas Th1 y Th2 en sujetos expuestos crónicamente a Pb	Dobrakowski <i>et al.</i> , 2016

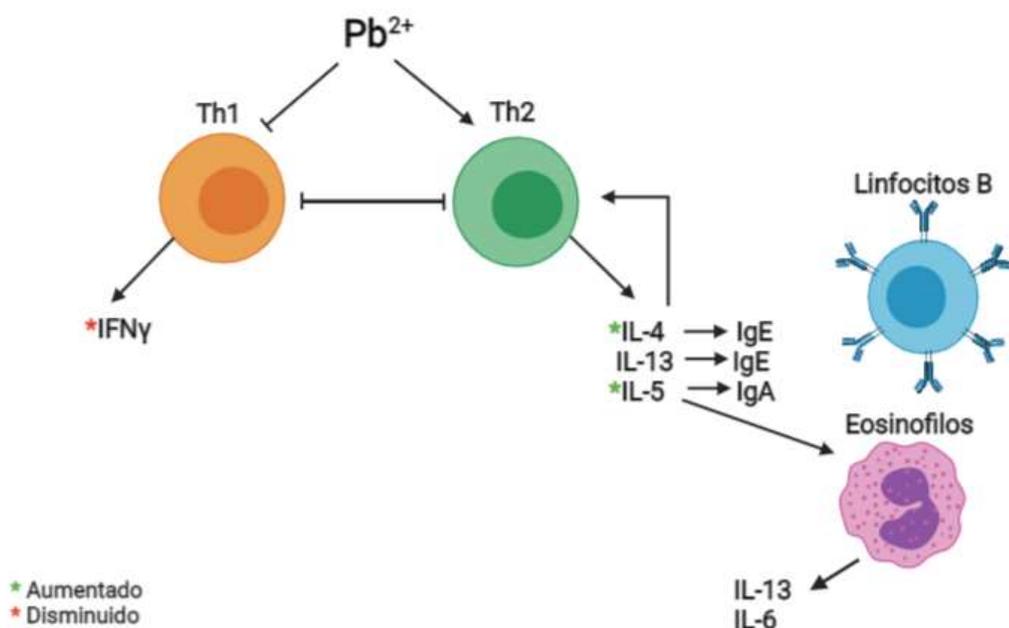


Figura 1. Esquematzación del efecto del Pb en los linfocitos T y B. La exposición al Pb se ha relacionado con una supresión de la respuesta tipo Th1 que contribuye a la disminución de los niveles de $IFN\gamma$ y un favorecimiento en la diferenciación de los linfocitos Th2 que en consecuencia eleva los niveles de citocinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL-5), efectos descritos en la tabla 2.

Uno de los componentes celulares de la inmunidad innata más sensible a los efectos del Pb es el macrófago. En condiciones basales y en macrófagos inflamatorios, se ha reportado que el Pb disminuye la viabilidad, la fagocitosis, la producción de óxido nítrico ($NO^{\cdot-}$) y altera la secreción de algunas citocinas producidas por estas células (Tabla 3) (Kasten-Jolly & Lawrence, 2014). Se ha propuesto que una de las consecuencias de la toxicidad del Pb en el sistema inmune es la disminución de la defensa del huésped ante diversos patógenos (Tabla 4) (Mishra, 2009).

Tabla 3. Efecto del Pb en macrófagos

Estudio	[Pb]	Resultado	Referencia
Macrófagos esplénicos	70 – 190 µg/dL	Disminución de NO [•]	Tian, 1995
Macrófagos de aves de corral	100000 µg/dL	Reducción del 50% de macrófagos fagocíticos	Knowles & Donaldson, 1997
Monocitos de sangre de niños de 6 a 11 años	3.47–49.19 µg/dL	Asociación negativa de la producción de NO [•] con PbS ($\beta=0.00089$; $p=0.036$) en monocitos activados con LPS+IFN γ	Pineda-Zavaleta <i>et al.</i> , 2004
Macrófagos de ratón J744A.1	0.05-5 µg/dL	Efecto bifásico en la secreción de IL-6, TNF- α e IL-1 β estimulados con LPS de <i>Escherichia coli</i> y NO [•] con LPS de <i>Salmonella Typhimurium</i>	Luna-Torres, 2012
Macrófagos de ratón J744A.1	0.05-10 µg/dL	Disminución de NO [•] en relación con la concentración	Castro-Martínez, 2017
Macrófagos de ratón RAW 264.7	100 µg/dL	Disminución de fagocitosis, NO, IL-6 y TNF- α y aumento de ROS en macrófagos activados	Williams <i>et al.</i> , 2019
Macrófagos THP-1	1.25 -10 µg/dL	Incremento en la producción de IL-6 e IL-1 β en macrófagos en condiciones basales	Metryka <i>et al.</i> , 2020
Monocitos y macrófagos THP-1	1.25 -10 µg/dL	Disminución de la viabilidad concentración y tiempo dependiente (apoptosis)	Metryka <i>et al.</i> , 2021

Tabla 4. La exposición a Pb disminuye la respuesta inmune contra patógenos

Modelo de estudio	[Pb]	Resultado	Referencia
Mosca <i>Drosophila melanogaster</i>	0.9 Mm–1.8 Mm de Pb	Incremento en la susceptibilidad a la infección por <i>Bacillus subtilis</i>	Nanda <i>et al.</i> , 2019
Ratón	100-250 µg de nitrato de plomo	Aumento a la susceptibilidad de <i>S. typhimurium</i> y a la mortalidad de manera dosis dependiente.	Hemphill <i>et al.</i> , 1971
Ratón	4 -100 µg/dL	Reducción de resistencia a <i>Listeria monocytogenes</i>	Lawrence, 1981
Ratón	40 -1000 µg/dL	Aumento de <i>L. monocytogenes</i>	Kowolenko <i>et al.</i> , 1991
Ratón	2 Mm de acetato de plomo	IL-12 exógena aumentó la resistencia al reto con <i>L. monocytogenes</i>	Kishikawa <i>et al.</i> , 1997
Ratón neonatal	0.5 Mm de acetato de plomo	Potenciada y prolongada enfermedad debida a infección por <i>L. monocytogenes</i>	Dyatlov & Lawrence, 2002
Ratón	62.5, 125, 250, o 500 mg/kg peso corporal (acetato de plomo)	incremento en la mortalidad por reto con el virus Semliki Forest y disminución en el tiempo de supervivencia media	Gupta <i>et al.</i> , 2002
Rata	2 mg /100 g de peso corporal (acetato de plomo)	Aumento en la mortalidad por <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphilococcus epidermis</i>	Cook <i>et al.</i> , 1975
Rata	13.14 µg/m ³ (cloruro de plomo)	Reducción en la eliminación de <i>Serratia marcescens</i>	Schlipkötter, 1979
Población expuesta laboralmente (Korea)	10 a 20 µg/dL	Mayor riesgo de muerte por infecciones y enfermedades digestivas por exposición a Pb (RR = 3.73 (1.06–13.06) y RR = 3.23(1.33–7.86))	Kim <i>et al.</i> , 2015
Población expuesta ambientalmente (Estados Unidos)	\bar{x} = 1.5 µg/dL	Mayor probabilidad de seropositividad a <i>Helicobacter Pylori</i> (OR= 21.2, 95% CI = 8.32–53.8) y <i>T. gondii</i> (1.19, 95% CI = 1.12–1.28) con exposición a Pb.	Krueger & Wade, 2016
Población expuesta ambientalmente (Korea)	2.96 ± 1.33 µg/dL	Mayor probabilidad de tener infección por <i>H. pylori</i> en sujetos con mayor PbS (OR: 1.143)	Park <i>et al.</i> , 2019

1.2 Sistema inmune

El sistema inmune se integra por numerosas células y moléculas que funcionan cooperativamente en la respuesta de defensa hacia un antígeno o patógeno. Tal respuesta inmune es mediada por reacciones tempranas de la inmunidad innata, la primera línea de defensa contra patógenos, y por una respuesta poco más tardía, la inmunidad adaptativa, dividida por sus mecanismos efectores en inmunidad humoral y celular (Figura 2) (Abbas *et al.*, 2015). Los macrófagos tienen una participación crucial tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa ya que participan en el reconocimiento, la fagocitosis y la destrucción de los patógenos, para posteriormente presentar los antígenos y secretar una gran variedad de productos (enzimas, citocinas, quimiocinas, componentes del complemento, entre otros) relacionados con la inmunidad innata y la adaptativa (Fujiwara & Kobayashi, 2005).

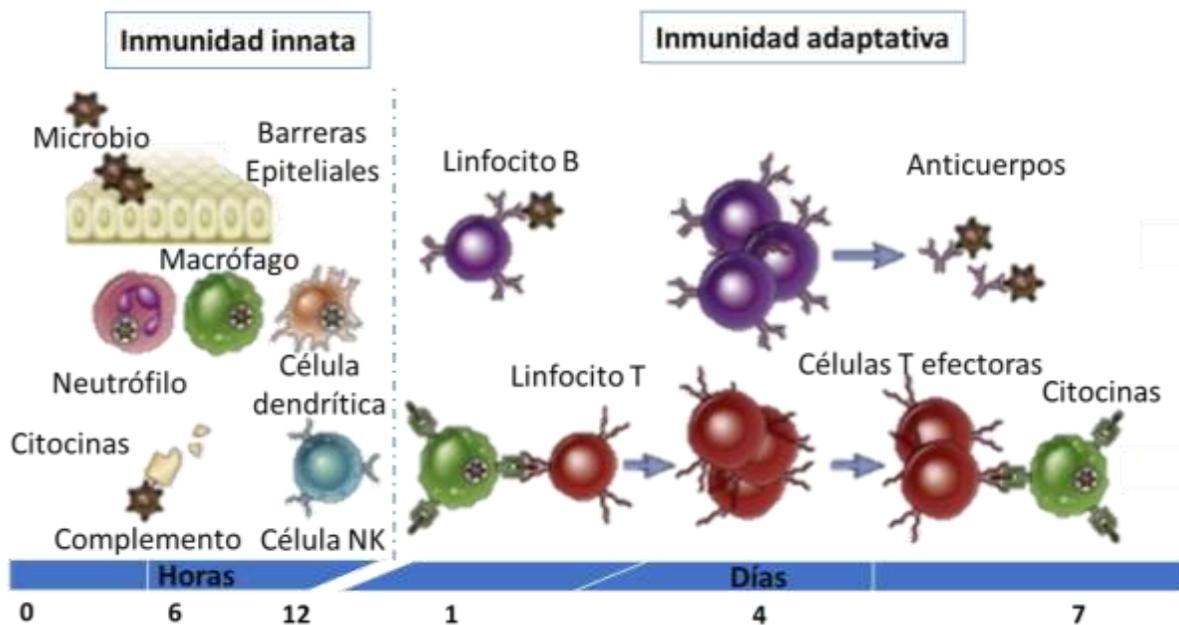


Figura 2. Células implicadas en la respuesta inmune (tomada de Abbas *et al.*, 2015).

1.2.1 Macrófagos

Los monocitos son una población de leucocitos mononucleares que constituyen aproximadamente el 10% de células sanguíneas en los seres humanos. Una vez liberados los monocitos de la medula ósea a la sangre circulante, pueden migrar a diversos tejidos del cuerpo y diferenciarse en macrófagos. De acuerdo al sitio de reclutamiento, los macrófagos residentes reciben diferentes nombres, entre estos: microglía (cerebro), células de Kupffer (hígado) y osteoclastos (medula ósea) (Chavez-Galvan *et al.*, 2015). Tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa, la generación de diversas citocinas y la presencia de productos microbianos en estos microambientes determinan las características funcionales de los macrófagos, que se polarizan hacia un fenotipo inflamatorio o anti-inflamatorio, los cuales tienen funciones efectoras diferentes; el inflamatorio participa en la defensa del huésped contra patógenos, mientras que el anti-inflamatorio participa en la reparación del daño en los tejidos. Por lo anterior, se considera que los macrófagos son células con una plasticidad alta y heterogeneidad funcional (Mcwhorter *et al.*, 2013).

1.2.2 Macrófagos inflamatorios

Los macrófagos inflamatorios muestran una capacidad microbicida y tumoricida, principalmente mediada por la secreción de moléculas con actividad inflamatoria (Mosser & Edwards, 2008). La estimulación para activar este fenotipo está dada por productos microbianos, ligandos de receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés), como LPS (lipopolisacárido) o citocinas inflamatorias como IFN γ y Factor de Necrosis Tumoral (TNF, por sus siglas en inglés)- α producidas por linfocitos Th1 y células NK (*Natural Killers*, por sus siglas en inglés) (Mosser, 2003). Las características típicas de los macrófagos inflamatorios se deben a la señalización asociada a los TLRs y a las citocinas que inducen la activación y translocación al núcleo de proteínas como Factor Nuclear (NF)- κ B y del transductor de señal y activador de transcripción (STAT) 1 a través del reconocimiento del LPS y el IFN γ por su respectivo receptor. En el núcleo, éstos factores de transcripción se unen a

los elementos en los promotores de genes que codifican IL-1, IL-12, TNF- α y iNOS, entre otros (Jablonski *et al.*, 2015; Lawrence & Natoli, 2011).

1.2.3 Mediadores de la función inflamatoria del macrófago.

1.2.3.1 NO[•]

El NO[•] es una especie reactiva tóxica a concentraciones altas; los macrófagos inflamatorios lo sintetizan a partir de L-arginina (L-Arg) mediante la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, por sus siglas en inglés) (Rath *et al.*, 2014). La toxicidad de esta molécula en microorganismos y células tumorales se produce a través de dos mecanismos principales: 1) La inhibición de diferentes enzimas debida a la afinidad del NO[•] por proteínas de unión a Fe²⁺, algunas de las enzimas blanco del NO[•] están implicadas en el transporte mitocondrial de electrones (complejo I y II), en la limitación de la tasa de replicación de ADN (ribonucleótido reductasa) y en la regulación del ciclo del ácido cítrico (aconitasa). 2) La ruptura y fragmentación de las hebras de ADN (Förstermann & Sessa, 2012).

1.2.3.2 Citocina TNF- α

El TNF- α es una proteína con actividad autocrina y paracrina: existe en dos formas, una unida a membrana (mTNF- α) y otra en forma soluble (sTNF- α) (Musco & van Staden, 2010). La forma soluble se encuentra circulando en el plasma sanguíneo, permitiendo que llegue a sitios fisiológicos distantes (realizando su función endocrina). Ambas proteínas, sTNF- α y mTNF- α , se unen a los receptores transmembrana TNF-R1 (expresado constitutivamente en muchos tejidos) y TNF-R2 (expresado y regulado en las células inmunes). La unión de sTNF- α a TNF-R1 induce la activación de caspasas 3 y 8 implicadas en la muerte celular por apoptosis de células tumorales e infectadas con virus. La unión de mTNF- α al TNF-R2 induce vías de señalización que desencadenan la activación de NF- κ B (implicado en el proceso inflamatorio) (Sedger & McDermott, 2014).

1.2.3.3 Citocina IL-1 β

La citocina IL-1 β es capaz de inducir la respuesta inflamatoria en todos los órganos del cuerpo. Es esencial en la respuesta inflamatoria aguda y para asegurar la recuperación de la infección o trauma. IL-1 β no se expresa constitutivamente en células inflamatorias; sin embargo, se sintetiza rápidamente como un precursor citosólico (pro-IL-1 β) a través de la vía asociada a los TLRs u otros receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés). Esto es, su secreción se activa por el reconocimiento de productos moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) o factores removidos de tejidos dañados (DAMPs, por sus siglas en inglés) (Sitia & Rubartelli, 2018). Al mismo tiempo que se activan los PRR, ocurre el reclutamiento de un complejo multiproteínico llamado inflamosoma que induce la activación de la caspasa 1, responsable de escindir la pro-IL-1 β hacia la forma activa IL-1 β , la cual se libera al espacio extracelular (Lopez-Castejon & Brough, 2011).

1.2.3.4 Receptor CD86

El receptor CD86 (B7-2) es una proteína transmembranal tipo 1 que se expresa principalmente en las células presentadoras de antígeno. Esta proteína funciona como ligando de CD28, que es una molécula co-estimuladora de los linfocitos T y es indispensable para activar estos linfocitos (Girard *et al.*, 2014).

1.2.3.5 Complejo principal de histocompatibilidad II (MHC II)

El complejo principal de histocompatibilidad II (MHC II, por sus siglas en inglés) es una molécula presentadora de antígeno que participa tanto en el desarrollo como en la activación de células T CD4⁺, con la finalidad de producir citocinas inflamatorias y combatir la infección. Las moléculas del MHC II se expresan en densidad alta en las células dendríticas; sin embargo, también se expresan en otros tipos celulares como los macrófagos que continuamente muestrean el ambiente y monitorean la presencia de antígenos microbianos, los que entonces se internalizan y procesan en los endolisosomas, generando péptidos pequeños que posteriormente se unirán a las moléculas MHC II presentes en los endosomas

y se transportarán a la membrana plasmática, en donde el complejo péptido antigénico-MHC II será reconocido por el complejo del receptor de antígenos de las células T (TCR, por sus siglas en inglés), que en conjunto con moléculas co-estimuladoras induce la activación de la respuesta de los linfocitos T (Oh & Shin, 2015).

1.2.4 Macrófagos anti-inflamatorios

La activación anti-inflamatoria de los macrófagos participa en la protección del huésped a través de la eliminación de patógenos específicos, la disminución del proceso inflamatorio y la reparación del tejido después de una infección u otro tipo de daño (Varin & Gordon, 2009). El fenotipo anti-inflamatorio se puede activar por diversos estímulos entre los que destacan citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-13 e IL-10) (Wang *et al.*, 2014).

Para llevar al cabo la activación de los macrófagos anti-inflamatorios debido a la presencia de IL-4 ó IL-13 se requiere la participación de STAT6. La interacción de estas citocinas con su receptor promueve la heterodimerización de las cadenas del receptor que activan las cinasas JAK1 y JAK3 induciendo la fosforilación de las tirosinas del receptor; STAT6 se une al dominio fosforilado del receptor y entonces se fosforila, se libera y forma un homodímero con una segunda molécula de p-STAT6. El complejo formado se transloca al núcleo y se une al promotor de los genes que codifican Arg1, TGF- β y receptor de manosa, entre otros (Varin & Gordon, 2009).

1.2.5 Mediadores de la función anti-inflamatoria del macrófago.

1.2.5.1 Actividad de Arg 1

La arginasa (Arg) es una enzima dependiente de Mn, que cataliza la hidrólisis de L-Arg a urea y L-ornitina. De este último producto se obtienen otros subproductos como las poliaminas y prolinas, implicados en la reparación de tejidos. La Arg existe en dos isoformas: la Arg 1 (citosólica) que se expresa abundantemente en hepatocitos, eritrocitos y células mononucleares y constituye la mayor actividad de

la Arg total del cuerpo; y la Arg 2 (mitocondrial) que se encuentra ampliamente distribuida en el riñón y la próstata (Durante *et al.*, 2007).

1.2.5.2 Receptor de manosa CD206

El receptor de manosa CD206 es un receptor que se expresa altamente en macrófagos y se ubica mayoritariamente dentro de la célula, el cual tiene la función principal de reconocer y endocitar glicoproteínas y glicolípidos que se encuentran en la superficie de patógenos muy diversos (virus, hongos y bacterias) para poder presentarlos posteriormente. También participa en la limpieza de glicoproteínas de circulación (hormonas glicoproteicas sulfatadas y glicoproteínas) removidas en respuesta a eventos patológicos. A su vez, el receptor existe en forma soluble (debido a escisión proteolítica), el cual reconoce carbohidratos manosilados y sulfatados que pueden alterar la respuesta inmune innata y adaptativa (Martinez-Pomares, 2012).

1.2.5.3 Factor de crecimiento transformante (TGF)- β

El TGF β , por sus siglas en inglés regula una gran variedad de procesos celulares como la proliferación, la apoptosis, la senescencia, la reorganización de la matriz extracelular y la migración (Gong *et al.*, 2012). En macrófagos, el TGF β inhibe procesos de tipo inflamatorio como fagocitosis (disminuye la expresión de receptores IgG, Fc γ RI y Fc γ RIII), presentación de antígeno (reduce la expresión de la molécula co-estimuladora CD40) y la secreción de citocinas inflamatorias (IL-12, IL1 β , TNF α). El TGF β existe en tres isoformas (1, 2 y 3), sin embargo, la isoforma predominante en el sistema inmune es la TGF β 1 (Li *et al.*, 2006). Esta citocina se sintetiza como un precursor prepro-TGF β , el cual se procesa en el aparato de Golgi mediante la remoción de la región pre que contiene un péptido señal. De igual manera, el TGF β maduro se une no covalentemente con una proteína asociada a latencia (LAP, por sus siglas en inglés). Este complejo se denomina TGF β latente o complejo latente pequeño (SLC, por sus siglas en inglés). El SLC se puede secretar como tal o en asociación con otra proteína de unión a TGF β latente (LTBP, por sus siglas en inglés) como un complejo latente grande (LLC, por sus siglas en inglés). El LTBP juega un papel importante en

dirigir al TGF β a la matriz extracelular. El TGF β no puede unirse a sus receptores (TGF- β RI y TGF- β RII) en forma latente, es necesario que se libere de LAP y LTBP. Posterior a la unión del TGF β a sus receptores se desencadena la vía liderada por las proteínas SMAD (combinación de las siglas en inglés SMA (cuerpos pequeños) y MAD (madres contra la decapentaplejía)) (Yan *et al.*, 2018).

Los macrófagos tienen un papel central en la inmunidad innata y adaptativa mediada por células contra los patógenos intracelulares. Estas células participan en el proceso inflamatorio y en la resolución del daño después de la inflamación (Oishi & Manabe, 2018), logrando fenotipos opuestos, ya sea inflamatorio o anti-inflamatorio dependiendo de los estímulos. Bajo el estímulo inflamatorio, los macrófagos producen y liberan TNF- α , e IL-1 β , entre otras citocinas que aumentan la expresión de iNOS, enzima que metaboliza la L-arg en L-citrulina y NO $^{\bullet}$ (una molécula microbicida crítica) (Mori & Gotoh, 2004; Yang, Yuk, & Jo, 2009). La Arg 1 regula negativamente el proceso inflamatorio al competir con iNOS por la L-Arg. La Arg1 metaboliza a la L-Arg en L-ornitina y urea; la L-ornitina es un precursor de la prolina necesaria en la reparación de los tejidos. Las vías metabólicas de la L-Arg en los macrófagos inflamatorios y anti-inflamatorios se regulan negativamente entre sí (Mori & Gotoh, 2004).

A pesar de la evidencia de que la exposición al Pb induce varias alteraciones en los macrófagos inflamatorios, todavía no se han evaluado los efectos del Pb en los macrófagos anti-inflamatorios (Figura 3). Dado que no existe algún estudio sobre si los efectos del Pb en los macrófagos inflamatorios son el resultado de una modulación positiva del fenotipo anti-inflamatorio, este estudio tuvo como objetivo determinar los efectos de las concentraciones de Pb ambientalmente relevantes (0.03 – 6.0 μ g/dL, equivalentes a 0.014 – 2.89 μ M) en los marcadores de activación de los fenotipos de macrófagos inflamatorios y anti-inflamatorios. Nos centraremos en establecer si existe una relación entre los efectos del Pb sobre cada fenotipo de los macrófagos, y si la alteración se relaciona con el efecto del Pb sobre el conjunto de las vías de activación fenotípica de los macrófagos.

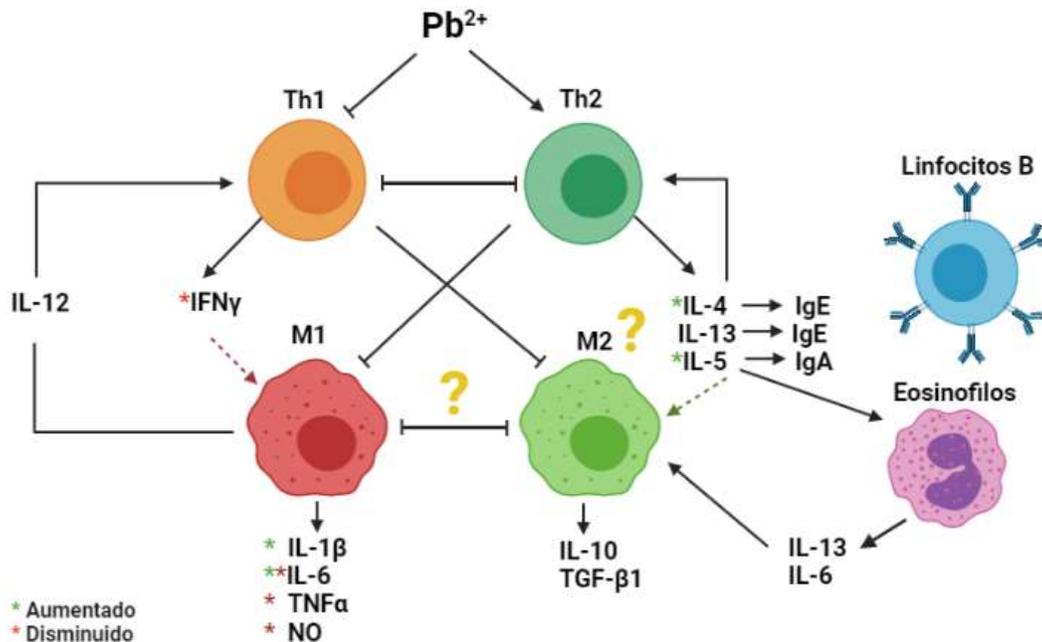


Figura 3. Esquematación de los efectos descritos del Pb sobre linfocitos (T y B) y macrófagos y las interacciones entre estos.

1.3 Justificación

El Pb es un metal ampliamente utilizado en la fabricación de diversos insumos, siendo la razón principal de su persistencia en el ambiente.

A pesar de su gran importancia industrial, la exposición ocupacional o ambiental Pb, a concentraciones $> 5 \mu\text{g/dL}$ de PbS, produce efectos adversos en sistemas como el nervioso, el renal, el hematopoyético y el inmune.

En el sistema inmune, el Pb altera la función de células que regulan la respuesta inmune, afectando la respuesta contra los patógenos.

La exposición al Pb se ha relacionado con una supresión de la respuesta tipo Th1 y un favorecimiento en la diferenciación de la respuesta tipo Th2.

El Pb altera la función de los macrófagos aumentando la susceptibilidad a infecciones, disminuyendo la producción de NO^* y citocinas inflamatorias.

La funcionalidad de los macrófagos está determinada por la activación con diferentes señales, modulando su función en la defensa y protección del huésped

contra patógenos (fenotipo inflamatorio), así como la reparación de tejidos (fenotipo anti-inflamatorio).

Por lo anterior, fue de nuestro interés estudiar si el Pb afecta a los macrófagos anti-inflamatorios, y si el efecto del Pb sobre los macrófagos del perfil inflamatorio es el resultado a una retroalimentación negativa entre ambos fenotipos.

1.4 Hipótesis

La exposición a Pb afecta negativamente a los macrófagos inflamatorios a través de la regulación positiva del fenotipo anti-inflamatorio.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Determinar el efecto del Pb en el fenotipo inflamatorio y anti-inflamatorio de macrófagos murinos, para establecer si el efecto de este metal sobre los macrófagos inflamatorios se debe a la regulación positiva del fenotipo anti-inflamatorio.

1.5.2 Objetivos particulares

Determinar el efecto de concentraciones ambientalmente relevantes de Pb en macrófagos activados hacia los fenotipos inflamatorio y anti-inflamatorio sobre:

1. La producción de NO[•] y la expresión de iNOS.
2. La expresión y secreción de TNF- α e IL-1 β .
3. La expresión membranal de CD86 y MHC II.
4. La actividad de Arg 1.
5. La expresión de CD206 y TGF- β 1.

2 Métodos

2.1 Reactivos

Los reactivos que se emplearon en el presente trabajo se detallan por uso o técnica realizada. Las células se mantuvieron con DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium) alto en glucosa al cual se adicionó 10% de suero fetal bovino de Gibco Invitrogen Co, (Grand Island NY), 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de piruvato de sodio y 3.7 g/L de Na_2HCO_3 de Sigma Aldrich (St. Louis MO). Para realizar los tratamientos se utilizó acetato de plomo, LPS de Sigma Aldrich (St. Louis MO), citocinas recombinantes de ratón: IL-4, IL13 e $\text{IFN}\gamma$ de Gibco Invitrogen Co, (Grand Island NY) y Factor Estimulante de Colonias de Monocitos y Granulocitos (GM-CSF) de Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). En los ensayos de viabilidad se utilizó MTT (bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difenitetrazolio) y DMSO (dimetil sulfóxido) de Bio Rad Laboratories (Hercules, CA). En la determinación de NO^* se utilizó sulfanilamida, N-(1-naftil) etilendiamina y KNO_2 de Sigma Aldrich (St. Louis MO), además de HCl de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). Para realizar la técnica de actividad de Arg se utilizó L-Arg, α -isonitrosopropiofenona, tritón X-100 y MnCl_2 de Sigma Aldrich (St. Louis MO), TrisHCl de BioRad Laboratories (Hercules, CA), H_2SO_4 , H_3PO_3 de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ) y urea de Sigma Aldrich (St. Louis MO). En la técnica de ELISA se usó Na_2HPO_4 de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ), sucrosa, albumina de suero bovino, tween 20 y TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) de Sigma Aldrich (St. Louis MO), streptoavidina de BioRad Laboratories (Hercules, CA). Finalmente, en citometría de flujo se utilizaron los anticuerpos anti-mouse: CD206-Alexa Flour 488, TGF- β 1-APC, CD86-PerCP/Cyanine5.5 y F4/80-PE/Cy7 de Biolegend; TNF- α -PE y MHC II-eFlour 450 de Invitrogen Co, (Grand Island NY), paraformaldehído de Sigma Aldrich (St. Louis MO), iNOS de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) acoplado con APC (1:2000) de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc (West Baltimore Pike West Grove, PA), azida de sodio Sigma Aldrich (St. Louis MO), glucosa, NaCl de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ) y buffer Perm/Wash (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.2 Estrategia experimental

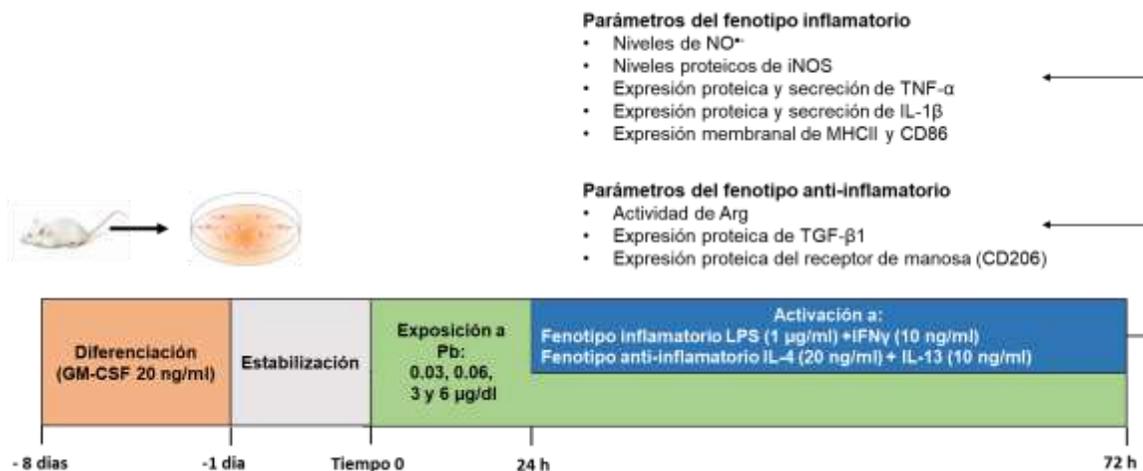


Figura 4. Estrategia experimental realizada en macrófagos derivados de medula ósea de ratón BALB/c (BMDM).

2.3 Características de los animales

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas, proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Cinvestav. Los ratones se mantuvieron siguiendo los lineamientos internacionales para el uso y cuidado de animales de laboratorio, y de acuerdo con el protocolo 293-19 aprobado por el Comité de Investigación para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Cinvestav-IPN (CICUAL). Los ratones se mantuvieron en condiciones de un ciclo de luz/obscuridad de 12 h a 20-22 °C, 40-60% de humedad, recibieron alimento y agua *ad libitum* y posteriormente se trasladaron del UPEAL al laboratorio, en cajas de polisulfonato, en donde se eutanizaron por dislocación cervical.

2.4 Cultivos celulares

2.4.1 Células de medula ósea de ratón

En los mamíferos, la medula ósea es un órgano complejo en el que se originan los eritrocitos, las plaquetas y las células inmunes (Heideveld & van den Akker, 2017). Los macrófagos derivados de medula ósea (BMDM) son un modelo *in vitro* ideal para entender los mecanismos que controlan la polarización de macrófagos activados (Manzanero, 2012).

2.4.2 Aislamiento, diferenciación y cultivo de las células de medula ósea

Los ratones se eutanizaron por dislocación cervical, posteriormente se sumergieron en alcohol (70%). Se removió la piel, para obtener las cuatro extremidades, se retiró el músculo de los huesos largos (tibia, peroné, fémur, húmero, radio y cúbito), se retiró la epífisis de los huesos utilizando pinzas y tijeras estériles para sostenerlos y cortar los extremos y posteriormente se realizó la perfusión de estos con una jeringa conectada a una aguja usando aproximadamente 5 mL de solución salina por hueso, la cual se depositó en un tubo de 50 mL. La solución obtenida se centrifugó a 453 g durante 5 min, a 4 °C; posteriormente se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 10 mL de medio DMEM-Complementado (DMEM-C) (DMEM suplementado con 20% de SFB y 1% de penicilina/estreptomicina) y se contó el número de células que se obtuvieron, utilizando una cámara de Neubauer. Para el conteo se colocaron 10 µL de la mezcla de la suspensión celular y de azul de tripano al 0.5% (dilución 1:1) y se determinó el número de células en un microscopio invertido, utilizando un objetivo de 40X para contraste de fases. Se enfocó tanto el patrón de la cuadrícula (cuadrante grande central) como las células y se realizó el conteo de los cuatro cuadrantes de las esquinas y el cuadrante central dentro del cuadrante central grande de ambas cámaras y se procedió a realizar el cálculo del número de células de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\text{Células por } \mu\text{L} = \frac{\text{Conteo de las dos cámaras de recuento}/2}{\text{Superficie de conteo (mm}^2\text{)} \times \text{Profundidad de la cámara (mm)} \times \text{Dilusión}}$$

Se sembraron 9×10^4 células por pozo en placas de 12 pozos, en 1 mL de medio DMEM-C. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C, con ambiente húmedo y 5% de CO₂. Para diferenciar las células se adicionaron 20 ng/mL de GM-CSF el día de la obtención. Al tercer y quinto día se adicionaron 500 µL de DMEM-C y 20 ng/mL de GM-CSF y finalmente al séptimo día se retiró el medio y las células no adheridas. Las células se estabilizaron con DMEM-C suplementado con 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de piruvato por 24 h y después se realizaron los tratamientos como se ilustra en la figura 4 y se describen detalladamente en el apartado 2.5.

2.5 Tratamientos

Los tratamientos fueron los siguientes:

- a. Células no expuestas y sin estímulo (control).
- b. Células no expuestas y estimuladas al perfil inflamatorio con LPS¹ (1 µg/mL) e IFN γ ² (10 ng/mL).
- c. Células no expuestas y estimuladas al perfil anti-inflamatorio con IL-4² (20 ng/mL) e IL-13² (10 ng/mL).
- d. Células expuestas a las concentraciones de 0.03, 0.06, 3 y 6 µg/dL (0.0144, 0.0289, 1.44 y 2.89 µM) de Pb³ (preparados a partir de acetato de Pb y estimuladas al perfil inflamatorio con LPS (1 µg/mL) + IFN γ (10 ng/mL).
- e. Células expuestas a las concentraciones de 0.03, 0.06, 3 y 6 µg/dL (0.0144, 0.0289, 1.44 y 2.89 µM) de Pb, (preparados a partir de acetato de Pb) y estimuladas al perfil anti-inflamatorio con IL-4 (20 ng/mL) + IL-13 (10 ng/mL).

¹El LPS se preparó en PBS a una solución concentrada 100 veces respecto a la concentración final utilizada (1 µg/mL) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

²El IFN γ , IL-4 e IL-13 se prepararon en PBS con BSA 1%, como una solución concentrada 50-100 veces respecto a la concentración final utilizada y se almacenaron en alícuotas a -20 °C hasta su uso.

³La solución de Pb se preparó a partir de la sal de acetato de plomo. Ese se disolvió en agua, como una solución concentrada 100 veces respecto a la máxima concentración de Pb utilizada en los ensayos. La solución concentrada de acetato de Pb se almacenó a -20°C hasta su uso.

En el presente trabajo utilizamos acetato de plomo para la exposición a Pb debido a que esta sal de Pb tiene una solubilidad alta en agua y en el medio de cultivo (pH 7.4), a diferencia de la mayoría de los compuestos de Pb que son solubles en medios ácidos o básicos (Maret, 2017).

2.6 Determinación de la viabilidad celular por el método de la reducción de la sal de formazán (MTT)

2.6.1 Principio

Este es un ensayo colorimétrico que cuantifica la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difenitrazolio (MTT) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Las células captan el MTT e ingresa a la mitocondria donde se reduce a formazán, un compuesto insoluble y de color azul oscuro. El formazán se libera y disuelve con un solvente orgánico como el dimetil sulfóxido (DMSO). El formazán se cuantifica mediante el uso de un espectrofotómetro. Debido a que la reducción del MTT ocurre solamente en células metabólicamente activas, la actividad de succinato deshidrogenasa estima indirectamente la viabilidad celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Mossman, 1983).

2.6.2 Procedimiento

Las células se trataron de acuerdo al apartado **2.5**. Tres horas antes de terminar el tiempo del tratamiento se adicionaron 100 µL de MTT (5 mg/mL)/pozo, el cual previo a utilizar se disolvió en agua y se almacenó en un recipiente color ámbar. Al término del tiempo de tratamiento se retiró el medio y se adicionaron 300 µL de DMSO/pozo para liberar de las células y solubilizar los cristales de formazán y se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro de microplacas a 590 nm

(SpectraMax 250, Molecular Devices, Sunnyvale CA). La absorbancia fue proporcional a la viabilidad celular, considerando como un 100% a la viabilidad de las células control.

2.7 Determinación del NO[•] por el método de Griess

2.7.1 Principio

Es un ensayo colorimétrico que se utiliza para cuantificar nitritos y nitratos presentes en fluidos biológicos. Esta técnica se basa en la reacción de Griess (diazotización), en la cual el nitrito reacciona con la sulfanilamida en medio ácido, el ion diazonio formado se une con N-(1-naftil) etilendiamina para generar un azo que es de color morado y se puede cuantificar espectrofotométricamente a una longitud de onda de ~540 nm (Green *et al.*, 1982).

2.7.2 Procedimiento

La producción de NO[•] se evaluó en los sobrenadantes de los cultivos con los diferentes tratamientos. Se utilizaron 50 µL de muestra (por triplicado) que se transfirieron a placas de 96 pozos para posteriormente mezclarse con el reactivo de Griess (N-(1-naftil) etilendiamina y sulfanilamida) volumen/volumen (1:1). Posteriormente, se evaluó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro de microplacas (SpectraMax 250, Molecular Devices, Sunnyvale CA). La cantidad de NO[•] se determinó como nitritos utilizando una curva patrón de KNO₂ en medio DMEM-C en un rango de 0 a 50 µM. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado y la evaluación de cada muestra por triplicado.

2.8 Determinación de la actividad de la enzima Arg

2.8.1 Principio

La actividad de la enzima Arg se evalúa con una técnica colorimétrica que cuantifica la producción de urea a partir de la hidrólisis de la L-Arg. La urea sintetizada reacciona con el reactivo α-isonitrosopropiofenona a 95 °C, dando un compuesto de color rosa que se determina espectrofotométricamente a 545 nm (Corraliza *et al.*, 1994).

2.8.2 Procedimiento

Se recuperaron los sobrenadantes de los cultivos tratados a los tiempos determinados y se lisaron las células con 100 µL de solución de lisis (tritón X-100 0.1% en agua desionizada) durante 15 min. Después se adicionaron 100 µL de solución Tris-HCL en agua desionizada (50 Mm, pH 7.4) y 10 µL de MnCl₂ (100 Mm). Posteriormente, se tomaron 50 µL de muestra, se incubaron a 56 °C por 7 min para activar la enzima, se adicionaron 50 µL de L-Arg (0.5 M, pH 9) y se incubó la mezcla a 37 °C durante 2 h para evaluar las muestras provenientes de las células no activadas o de las activadas hacia el fenotipo inflamatorio; las muestras provenientes de las células hacia el fenotipo anti-inflamatorio, se incubaron por 15 min. Transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción agregando 400 µl de una mezcla de ácidos (H₂SO₄, H₃PO₄ y H₂O 1:3:7 v/v). Para llevar a cabo la reacción colorimétrica se agregaron 20 µl de α-isonitrosopropiofenona (6% disuelto en alcohol etílico), se centrifugaron los tubos e incubaron a 95 °C por 30 min. Al término de la incubación, los tubos se colocaron a 4 °C por 30 min y se determinó la absorbancia a 545 nm en un espectrofotómetro de microplacas (SpectraMax 250, Molecular Devices, Sunnyvale CA). La concentración de urea se calculó a partir de los valores obtenidos de una curva patrón de urea en medio ácido, en un rango de 0 a 480 µg/mL. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado y la evaluación de cada muestra por triplicado.

2.9 Determinación de interleucinas por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

2.9.1 Principio

La ELISA es una técnica que utiliza un anticuerpo específico contra el antígeno de interés, inmovilizado sobre una matriz sólida, que permite la captura del antígeno. El antígeno capturado se detecta a través de su reconocimiento por un anticuerpo secundario que lleva unida una enzima (anticuerpo de detección). En presencia de un sustrato adecuado de la enzima, se genera un producto soluble y colorido, que

es posible determinar por espectrofotometría. La absorbancia es proporcional a la concentración del anticuerpo de interés y es posible cuantificar utilizando una curva estándar del antígeno de interés (Lequin, 2005).

2.9.2 Procedimiento

La secreción y producción de interleucinas se determinó a partir de los sobrenadantes y lisados de los cultivos celulares sometidos a los diferentes esquemas de tratamientos y a los tiempos descritos en el apartado **2.5**. En el lisado de las células se determinó la concentración de las citocinas contenidas en las células, mientras que en el sobrenadante se evaluaron las citocinas secretadas. Para realizar los ensayos de ELISA se utilizaron placas Maxisorb™ (NUNC, Rochester, NY), y paquetes comerciales para detectar IL-1 β (DY401) y TNF- α (BAF410), siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems de DuoSet).

La absorbancia de las reacciones se determinó a 450 nm en un espectrofotómetro de microplacas (SpectraMax 250, Molecular Devices, Sunnyvale CA), calculando la concentración de las citocinas presentes en el sobrenadante de los cultivos interpolando las absorbancias en una curva patrón con concentraciones conocidas de cada una de las citocinas de interés. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado y la evaluación de cada muestra por triplicado.

2.10 Determinación de marcadores fenotípicos por citometría de flujo

2.10.1 Principio

El principio subyacente de la citometría de flujo está relacionado con la dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia que se produce cuando la luz de la fuente de excitación (normalmente un rayo láser) incide sobre una célula en movimiento dentro de una corriente de fluido. Los datos obtenidos aportan información valiosa sobre aspectos bioquímicos, biofísicos y moleculares de las células. La dispersión de la luz está directamente relacionada con las propiedades estructurales y morfológicas de la célula, mientras que la emisión de fluorescencia deriva de la excitación de un fluorocromo acoplado a un anticuerpo específico para un

marcador celular. La emisión de la fluorescencia es proporcional a la cantidad del anticuerpo unido a un componente celular de interés (Adan *et al.*, 2016).

2.10.2 Procedimiento

La evaluación de los marcadores fenotípicos de BMDM (tabla 5) se realizó en el citómetro de flujo FACS Canto (Becton Dickinson). Los anticuerpos se usaron a las concentraciones descritas en la tabla 5. El protocolo de tinción fue de acuerdo a (Turaç *et al.*, 2013), el cual es descrito en breve, se retiró el sobrenadante de los cultivos de células, se lavaron con PBS y se levantaron con un padastro utilizando 500 µL de solución FACS (PBS con 1% azida sódico y 2% de suero fetal bovino inactivado). Posteriormente, las células se centrifugaron a 542 g durante 3 min, a 4 °C; se retiró el sobrenadante y se realizó la tinción extracelular a 4 °C en agitación suave por 25 min en la oscuridad. Después las muestras se lavaron con 500 µL de solución FACS, se centrifugaron a 542 g durante 3 min, a 4 °C y se retiró el sobrenadante. Las células se fijaron utilizando 500 µL de *p*-formaldehído (al 2% en PBS) por 25 min, con agitación y a 4 °C y se lavaron. Posteriormente, las células se permeabilizaron con 500 µL de solución de permeabilización (Buffer Perm/Wash de BD) por 15 min a 4 °C en agitación. Se realizó un lavado con 500 µL de solución FACS, se centrifugaron a 542 g durante 3 min y se retiró el sobrenadante. Las muestras se tiñeron intracelularmente por 25 min a 4 °C en la oscuridad y agitación. Particularmente para la detección de iNOS, se realizó una incubación adicional con un segundo anticuerpo conjugado a APC, durante 25 minutos en la oscuridad. Para la evaluación de iNOS, se realizó marcaje solamente con F4/80 e iNOS. Finalmente, las células se lavaron con 500 µL de solución FACS, se centrifugaron a 542 g durante 3 min y se analizaron por citometría de flujo. Se capturaron al menos 10,000 eventos por muestra y se utilizó el software FlowJo para realizar el análisis de los datos de fluorescencia, tamaño y granularidad (obtenidos de la dispersión y difracción de la luz). La estrategia de selección de la población de interés se muestra en la figura 5.

Tabla 5. Anticuerpos usados en citometría de flujo para determinar la expresión de marcadores fenotípicos

Panel	Marcador	Fluorocromo	Marcaje	^a ($\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$)	Fabricante
1,2	^b F4/80	PE/Cy7	Extracelular	0.1	Biolegend, (San Diego, CA)
1	MHC II	eFlour 450	Extracelular	0.12	Invitrogen Co (Grand Island NY)
1	CD86	PerCP/Cy5.5	Extracelular	0.2	Biolegend, (San Diego, CA)
1	CD206	Alexa Flour 488	Intracelular	0.0125	Biolegend, (San Diego, CA)
1	TGF- β 1	APC	Extracelular	0.2	Biolegend, (San Diego, CA)
1	iNOS	^c APC (1:2000)	Intracelular	1.5	Santa Cruz Biotechnology, (Santa Cruz, CA) y ^c Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc (PA, USA), respectivamente

^aConcentraciones optimizadas obtenidas por titulación de anticuerpos

^bF4/80 fue usado para identificar a los macrófagos en ambos paneles.

^cDado que se utilizó un anticuerpo anti-iNOS sin marcar, se requirió un anticuerpo secundario conjugado con APC.

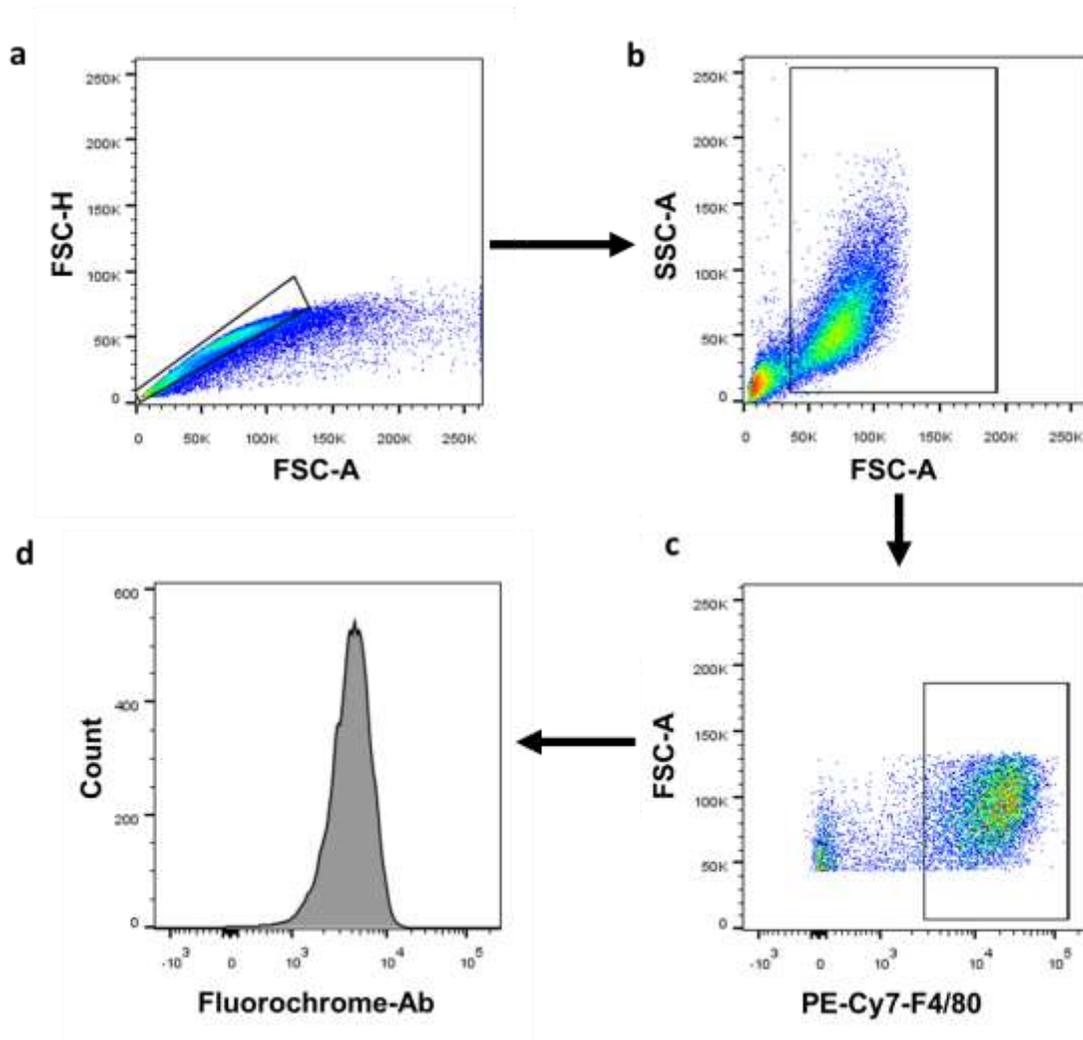


Figura 5. Estrategia de selección celular para identificar las subpoblaciones de los BMDM inducidos con estímulo inflamatorio y anti-inflamatorio para analizar la expresión de marcadores fenotípicos. A, las células se distribuyeron con FSC-H vs. FSC-A para seleccionar a las células individuales. **B,** las células individuales se distribuyeron con SSC-A vs. FSC-A para excluir las células muertas y detritus. **C,** las células restantes se seleccionaron por las marcas de FSC-A vs. F4/80-PE-Cy7 para identificar a los macrófagos. **D,** la intensidad de fluorescencia de cada marcador fue evaluada.

2.11 Análisis estadístico

Después de evaluar la normalidad de los datos utilizando la prueba Shapiro-Wilk se utilizó la prueba ANOVA de dos vías seguida de la prueba *post hoc* Bonferroni para comparar los grupos de tratamiento con Pb + activación (hacia cada fenotipo) con respecto a su control positivo. La prueba t de Student se utilizó para comparar el grupo sin tratamiento ni estímulo (control) con respecto al control positivo. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (SEM) de tres experimentos independientes por triplicado o duplicado. En todos los análisis se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$. Se utilizó el programa estadístico Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego CA, USA) para realizar el análisis estadístico.

3 Resultados

3.1 El Pb no afectó la viabilidad en los BMDM inflamatorios o anti-inflamatorio

Previo a realizar la evaluación del efecto del Pb sobre los marcadores fenotípicos de los macrófagos inflamatorios y anti-inflamatorios, se determinó el efecto del Pb sobre la viabilidad celular a través de la actividad metabólica celular con la finalidad de descartar que cualquier alteración en los marcadores fenotípicos, fuera atribuible a la pérdida de la viabilidad. La exposición a Pb (0.03, 0.06, 3 y 6 $\mu\text{g}/\text{dL}$) en los BMDM activadas con LPS + $\text{IFN}\gamma$ o IL-4 + IL-13 a las 72 h no mostró efectos significativos en la viabilidad (Figura 6), por lo cual todas las concentraciones se utilizaron en el resto de los experimentos.

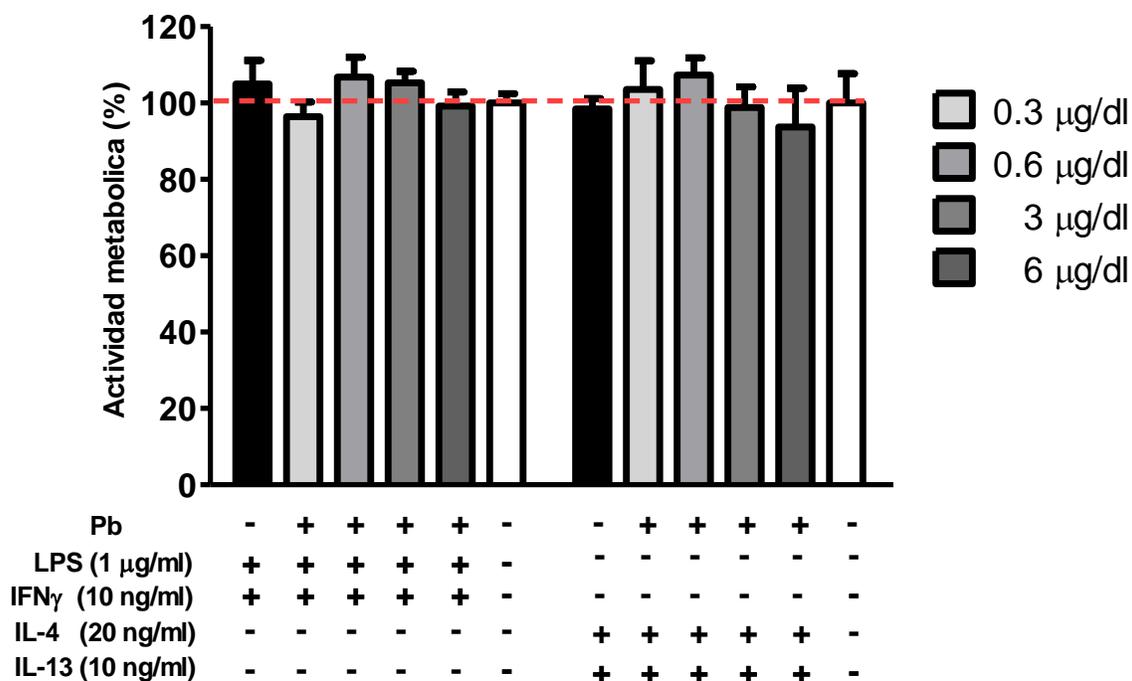


Figura 6. El Pb no afectó la viabilidad en los BMDM inflamatorios o anti-inflamatorio a las 72 h. Las barras representan la media \pm SEM del porcentaje de la actividad metabólica de los BMDM de tres experimentos independientes por duplicado. La línea roja punteada indica el 100% de la viabilidad celular. Se analizó por ANOVA de dos vías y t de Student.

3.2 El Pb disminuyó la producción de NO⁻ en los BMDM inflamatorio sin afectarla en los anti-inflamatorios

Aun cuando existen estudios realizados en modelos diferentes de BMDM que han demostrado una disminución en la producción de NO⁻ en condiciones inflamatorias por exposición a concentraciones altas de Pb, se decidió evaluar si el efecto del Pb (0.03, 0.06, 3 y 6 µg/dL) en los BMDM estimulados con inductores inflamatorios y anti-inflamatorios a las 72 h mediante la determinación colorimétrica de nitritos es similar a lo que se describe en otros tipos celulares. Los resultados mostraron una disminución significativa en la producción de NO⁻ con la concentración de 6 µg/dL de Pb en las células estimuladas con LPS e IFN_γ, sin afectar a los niveles basales de NO⁻ en las células estimuladas con IL-4 + IL-13 (figura 7).

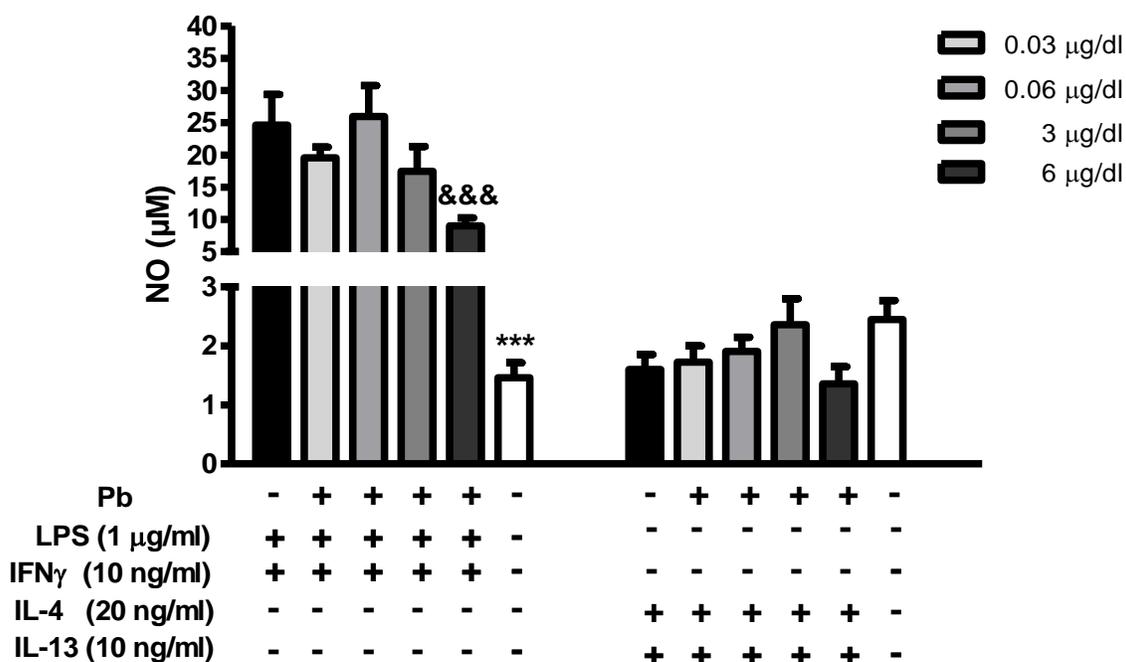


Figura 7. El Pb disminuyó la producción de NO⁻ en los BMDM inflamatorio sin afectarla en los anti-inflamatorios a las 72 h. Las barras representan la media ± SEM de la producción de NO⁻ en BMDM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. &&&p ≤ 0.001 Células tratadas con Pb y activadas con LPS+IFN_γ vs. control positivo (células solo activadas con LPS+IFN_γ); ***p ≤ 0.001 control positivo vs. células no tratadas (control). Se analizó por ANOVA de dos vías, *post hoc* Bonferroni y t de Student.

3.3 El Pb no afectó los niveles proteicos de iNOS en los BMDM inflamatorios

Debido a que la exposición a la concentración 6 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de Pb disminuyó la producción de NO^* decidimos evaluar el efecto del Pb sobre la expresión de iNOS; la cual es una enzima inducida en los macrófagos inflamatorios e implicada en la formación de NO^* . Se utilizaron los BMDM expuestos a 6 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de Pb y activados con LPS + $\text{IFN}\gamma$ para evaluar la intensidad de fluorescencia de iNOS a las 72 h. Los resultados mostrados en la figura 8 indican que el Pb (6 $\mu\text{g}/\text{dL}$) no afectó los niveles de iNOS.

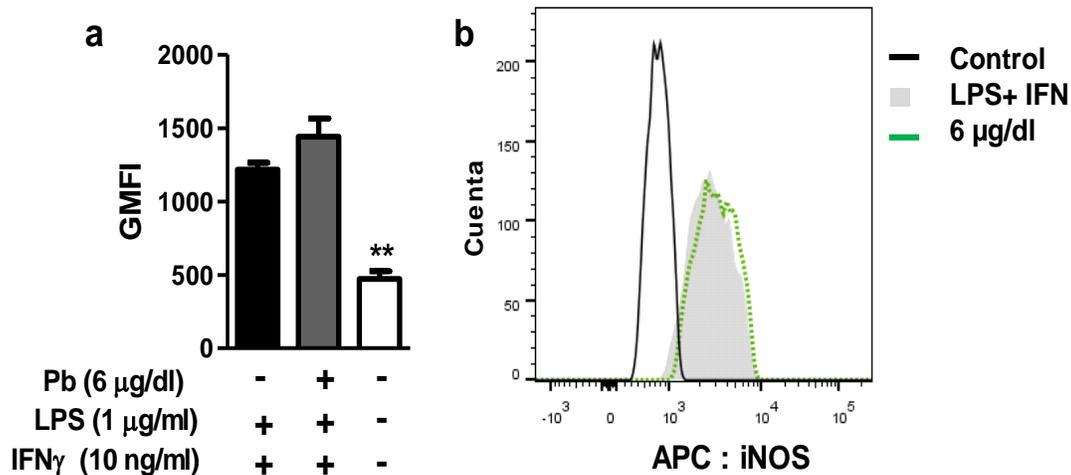


Figura 8. El Pb no afectó los niveles proteicos de iNOS en los BMDM inflamatorios a las 72 h. En **a**, las barras representan la media \pm SEM de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GMFI) de tres experimentos independientes de los niveles de iNOS en células tratadas con 6 $\mu\text{g}/\text{dL}$ de Pb y activadas con LPS+ $\text{IFN}\gamma$; en **b**, se presentan los histogramas de la GMFI de iNOS en los BMDM graficados en **a**. ** $p \leq 0.01$ Células activadas con LPS+ $\text{IFN}\gamma$ vs. células no tratadas (control). Se analizó por t de Student.

3.4 El Pb no afectó la actividad de la Arg 1 en los BMDM inflamatorios y anti-inflamatorios

La producción de NO[•] es también dependiente de la disponibilidad del sustrato L-Arg, el cual se utiliza tanto por iNOS como por Arg1 en los macrófagos inflamatorios y en los anti-inflamatorios, respectivamente (Rath *et al.*, 2014). Por lo anterior, a las 72 h se evaluó mediante la producción de urea el efecto del Pb sobre la actividad de la Arg 1 en los BMDM estimulados hacia los fenotipos inflamatorio y anti-inflamatorio. Los resultados mostraron que el Pb no modificó la actividad de la Arg 1 en ninguno de los fenotipos de los macrófagos (Figura 9).

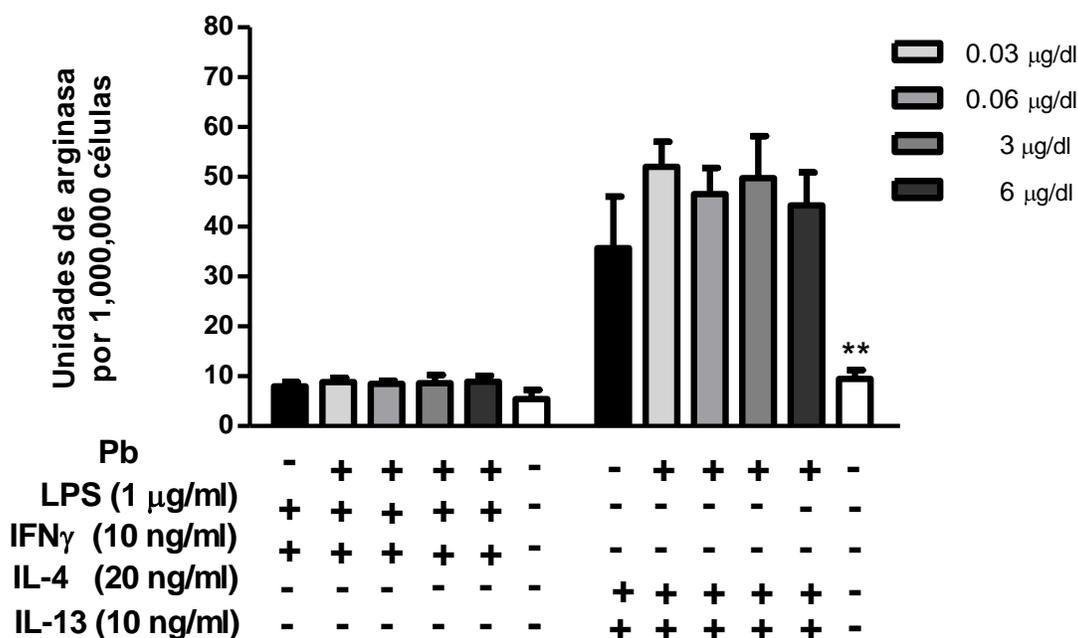


Figura 9. El Pb no afectó la actividad de la Arg 1 en los BMDM inflamatorios y anti-inflamatorios a las 72 h. Las barras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes, por duplicado, de la actividad de Arg1 de los BMDM de cada fenotipo evaluado. **p \leq 0.01, Células activadas con IL-4+IL-13 vs. Células no tratadas (control). Se analizó por ANOVA de dos vías y t de Student.

3.5 El Pb no afectó la producción ni secreción de TNF- α en los BMDM estimulados al fenotipo inflamatorio

Los macrófagos inflamatorios se caracterizan también por la producción y secreción de citocinas como TNF- α , implicada en el reclutamiento de otros tipos celulares al sitio de infección y en la apoptosis (Zelová & Hošek, 2013). Por lo anterior se decidió evaluar el efecto del Pb sobre la producción y secreción de TNF- α en los BMDM estimulados con LPS + IFN γ a las 72 h mediante su determinación colorimétrica por ELISA. Los resultados mostraron que el Pb no afectó la producción (Figura 10a) ni la secreción de TNF- α (Figura 10b) con ninguna de las concentraciones que se utilizaron.

3.6 El Pb no afectó la producción ni secreción de IL-1 β en los BMDM estimulados al fenotipo inflamatorio

Otra citocina inflamatoria típica de los macrófagos es la IL-1 β . Por lo anterior, se evaluó el efecto del Pb sobre la producción y secreción de esta citocina en los BMDM estimulados al perfil inflamatorio con LPS+IFN γ a las 72 h mediante su determinación colorimétrica por ELISA. En las figuras 11a y 11b se muestra que el Pb no afectó ni la producción ni secreción de IL-1 β .

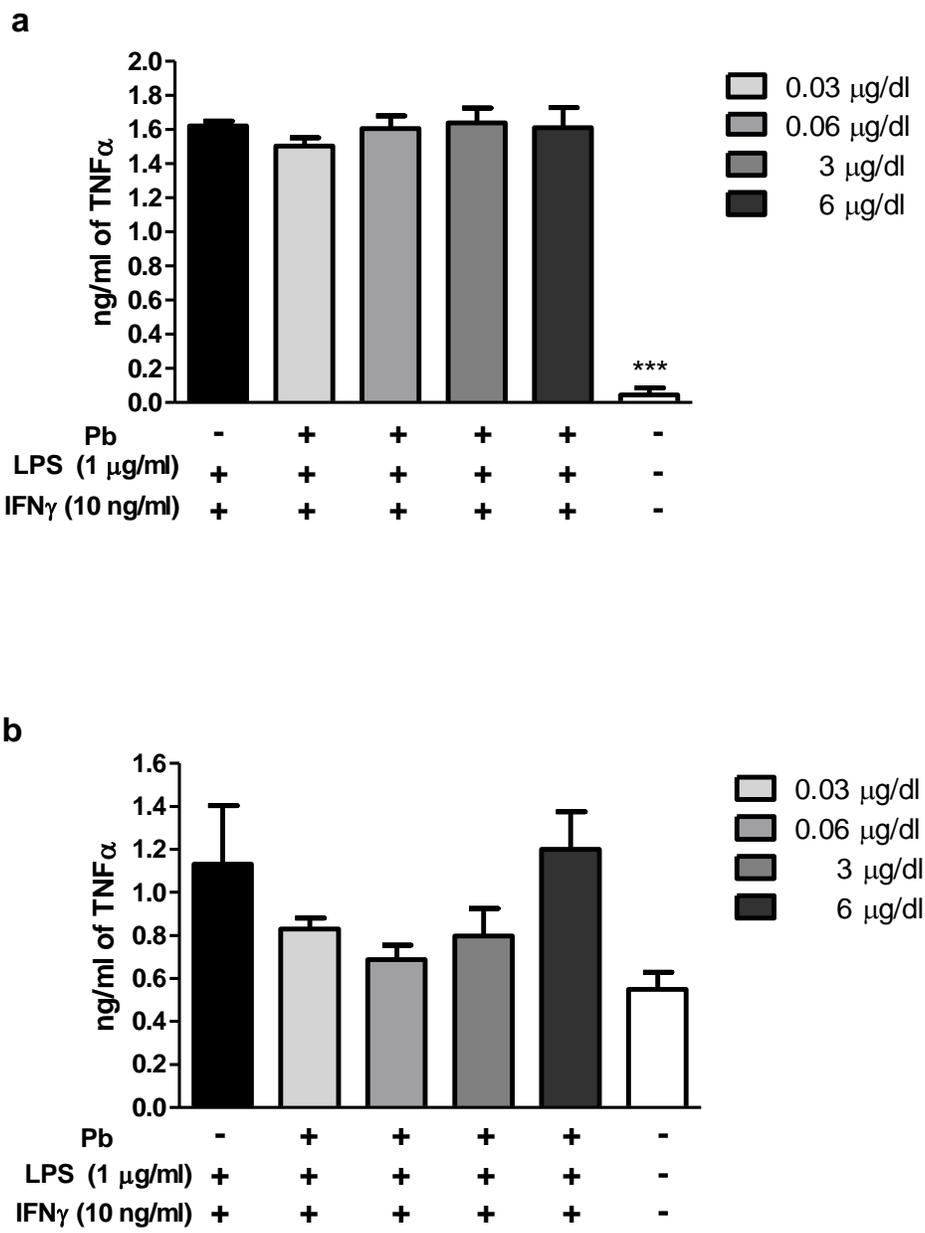
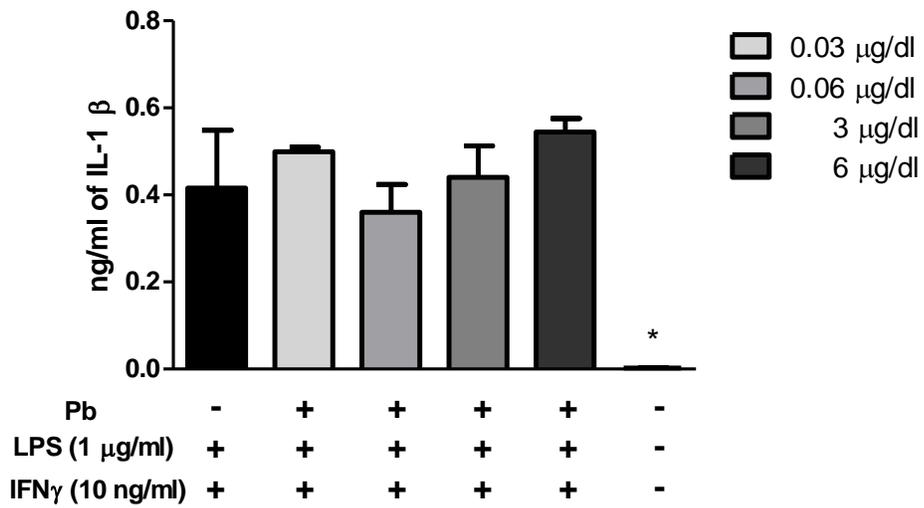


Figura 10. El Pb no afectó la producción ni secreción de TNF- α en los BMDM estimulados al fenotipo inflamatorio a las 72 h. Las barras representan la media \pm SEM de la **a** producción y **b** secreción de TNF- α en los BMDM, a partir de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *** $p \leq 0.001$ Células activadas con LPS+IFN γ , vs. células no tratadas (control). Se analizó por ANOVA de una vía y t de Student.

a



b

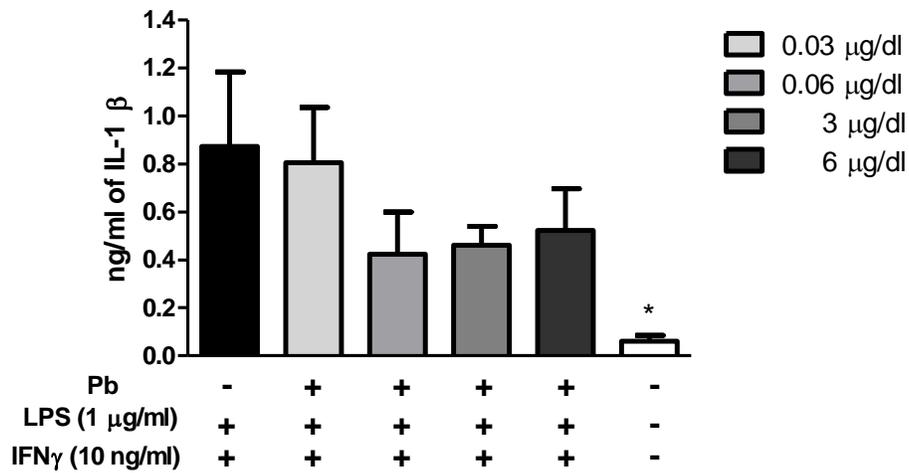


Figura 11. El Pb no afectó la producción ni secreción de IL-1 β en los BMDM estimulados al fenotipo inflamatorio a las 72 h. Las barras representan la media \pm SEM de la **a producción y **b** secreción de IL-1 β en los BMDM, de tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $p \leq 0.05$ Células activadas con LPS+IFN γ vs. células no tratadas (control). Se analizó por ANOVA de una vía y t de Student.**

3.7 El Pb aumentó la expresión de moléculas de MHC II (I-A/I-E), sin aumentar CD86 en los BMDM inflamatorios y sin afectar la expresión de ambos marcadores en el fenotipo anti-inflamatorio

Los macrófagos están implicados en la activación de linfocitos Th1 a través de las moléculas de MHC II y de CD86 (Holling *et al.*, 2004), por lo cual se evaluó el efecto del Pb sobre este par de marcadores inflamatorios en los BMDM inflamatorios y anti-inflamatorios a las 72 h a través de sus intensidades de fluorescencia determinadas por citometría de flujo. En las figuras 12a y 12b se muestra que la presencia del Pb (3 y 6 µg/dL) incrementó significativamente la expresión de MHC II en membrana en el fenotipo inflamatorio sin cambiar su expresión en células del anti-inflamatorio. Por otro lado, en las figuras 13a y 13b los resultados muestran que el Pb no afectó la expresión de CD86 en ningún de los dos fenotipos de los BMDM.

3.8 El Pb aumentó la expresión de moléculas de TGFβ1 y receptor de manosa (CD206) en los BMDM estimulados al fenotipo anti-inflamatorio sin afectarla en el fenotipo inflamatorio

El término del proceso inflamatorio ocurre a través de un proceso regulatorio de anti-inflamación y reparación de los tejidos dañados en donde participan la citocina TGFβ1 y el receptor de manosa (CD206) (Mosser & Edwards, 2008). Por lo anterior, se evaluó el efecto del Pb sobre estos marcadores fenotípicos anti-inflamatorios en los BMDM inflamatorios y anti-inflamatorios a las 72 h a través de sus intensidades de fluorescencia determinadas por citometría de flujo. En la figura 14a y 14b se muestra que la exposición a 3 y 6 µg/dL de Pb aumentó significativamente los niveles proteicos de TGFβ1 en los macrófagos anti-inflamatorios, sin afectar el de los inflamatorios. En las figuras 15a y 15b se muestra el efecto de 0.06, 3 y 6 µg/dL de Pb en los macrófagos anti-inflamatorios, en los cuales aumentó la expresión de CD206 sin afectar la expresión basal en el fenotipo inflamatorio.

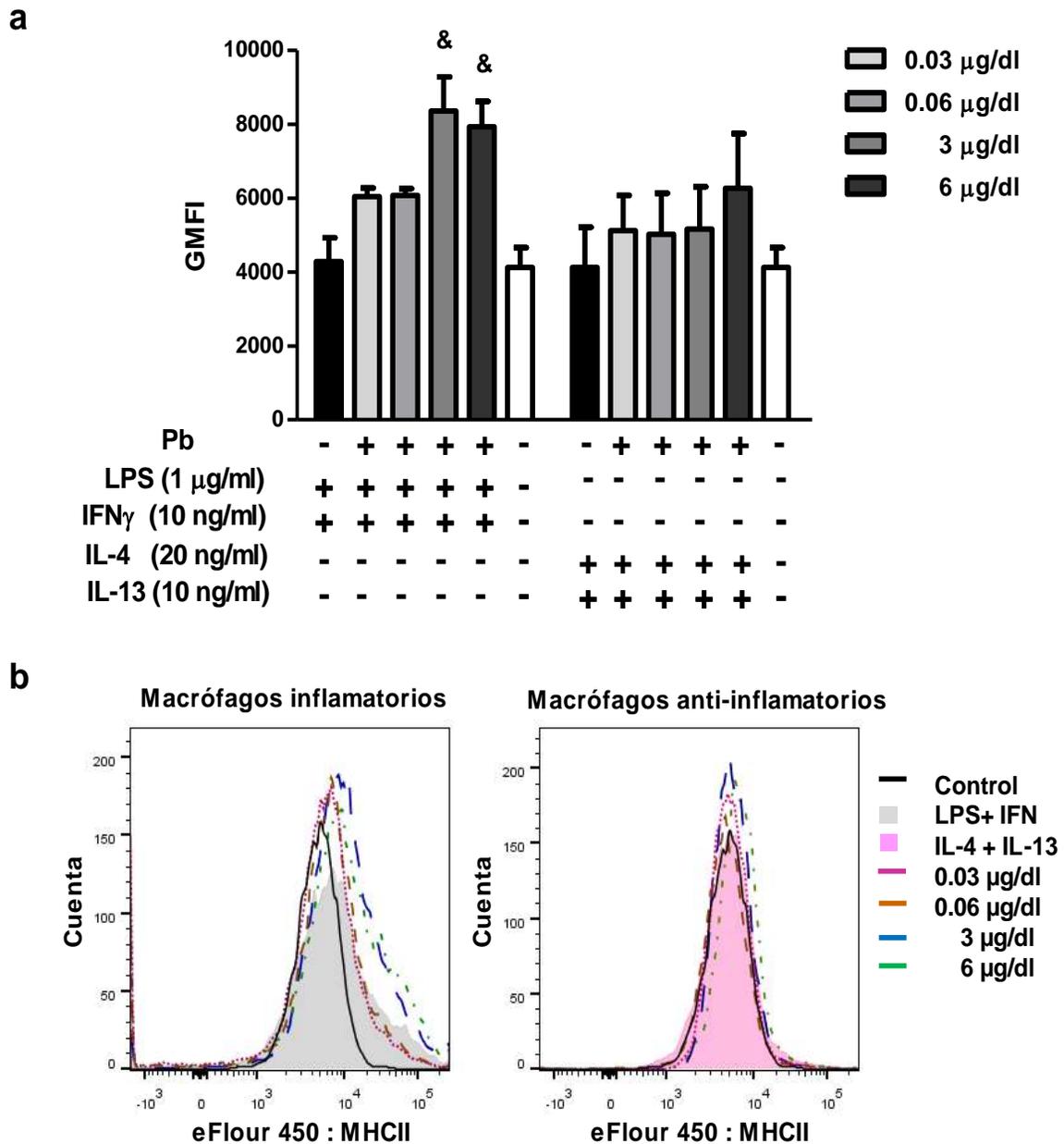


Figura 12. El Pb aumentó la expresión de moléculas de MHC II (I-A/I-E) en los BMDM inflamatorios sin afectar su expresión en el fenotipo anti-inflamatorio a las 72 h. En a, las barras representan la media \pm SEM de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GMFI) de MHC II y en b, se presentan los histogramas de la GMFI de MHC II en los BMDM de tres experimentos independientes. $^*p \leq 0.05$ Células tratadas con Pb y activadas con LPS+IFN γ vs. células solo activadas con LPS+IFN γ . Se analizó por ANOVA de dos vías, *post hoc* Bonferroni y t de Student.

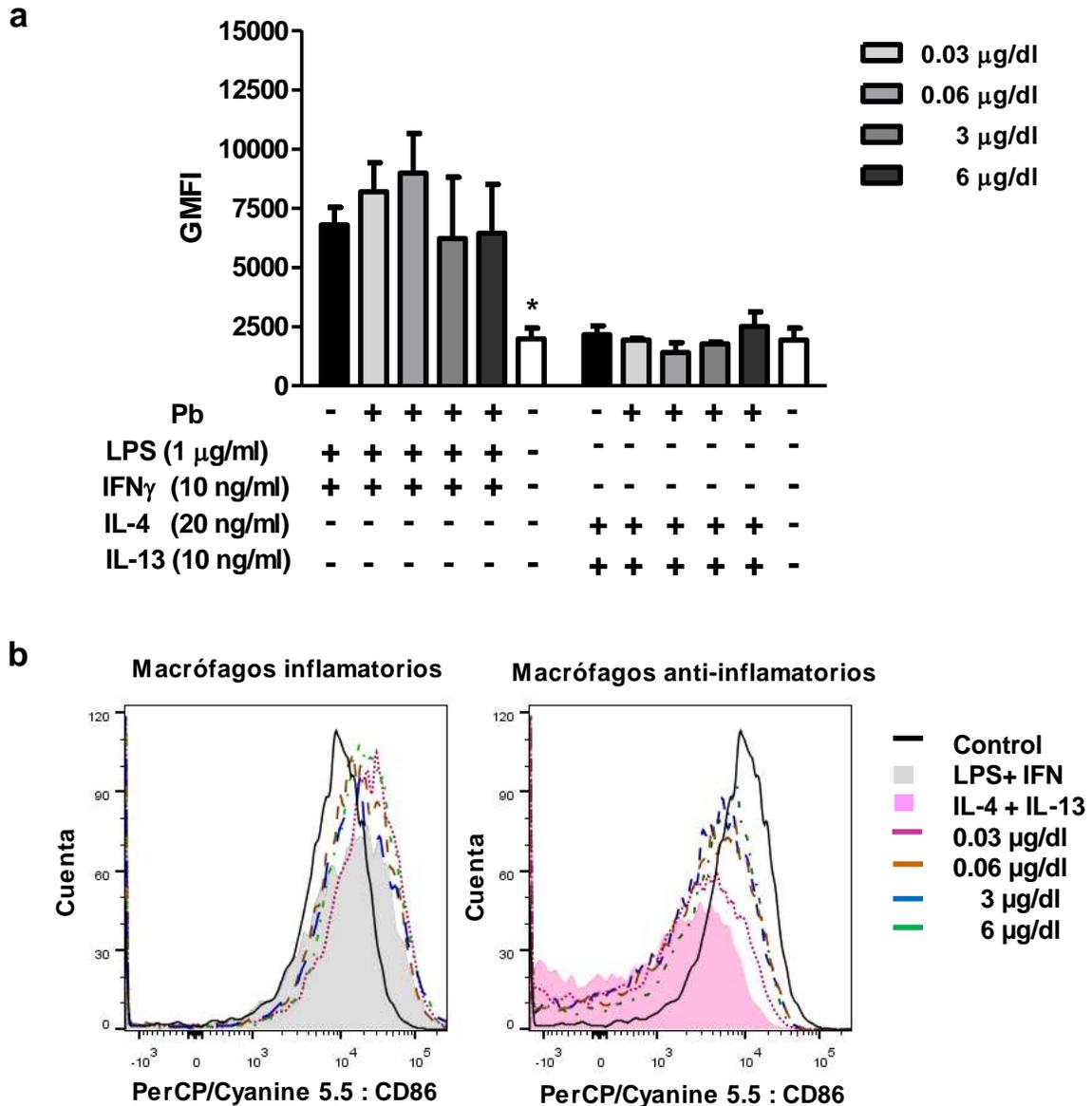
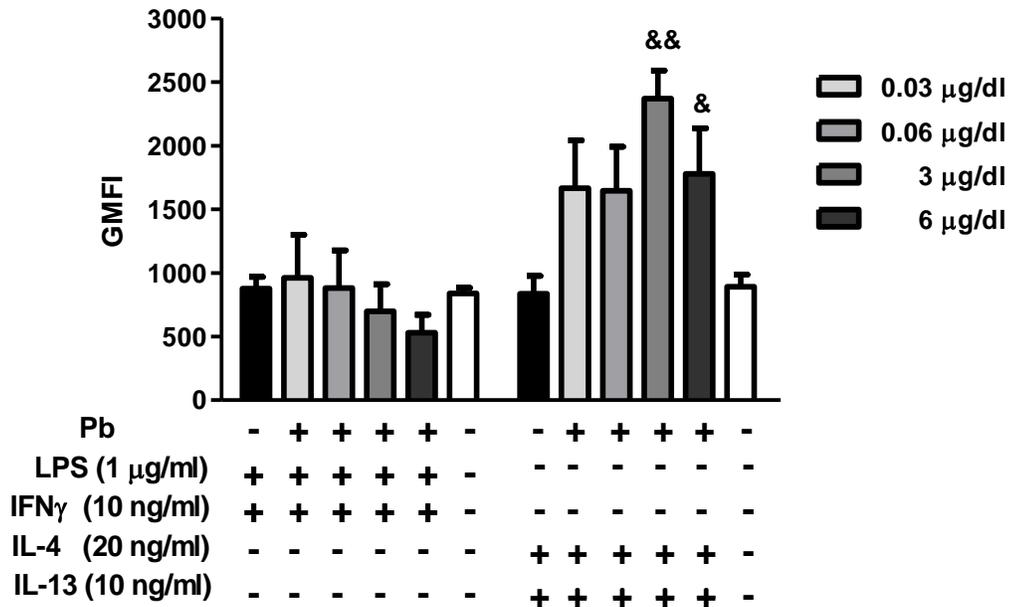


Figura 13. El Pb no alteró la expresión de CD86 en los BMDM estimulados a los fenotipos inflamatorio o anti-inflamatorio a las 72 h. En **a**, las barras representan la media \pm SEM de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GMFI) de CD86 y en **b**, se presentan los histogramas de la GMFI de CD86 en los BMDM de tres experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ Células activadas con LPS+IFN γ vs. células no tratadas (control). Se analizó por ANOVA de dos vías, *post hoc* Bonferroni y t de Student.

a



b

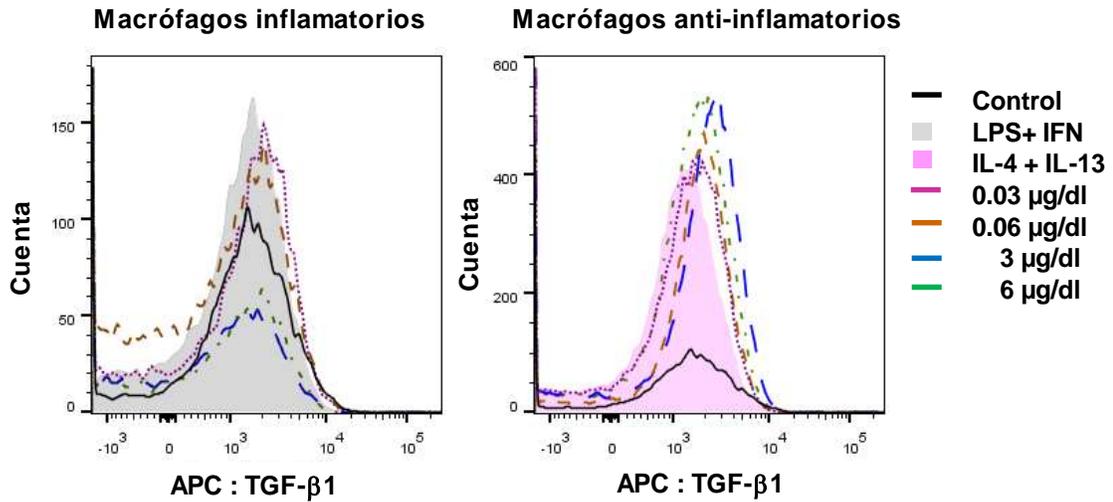
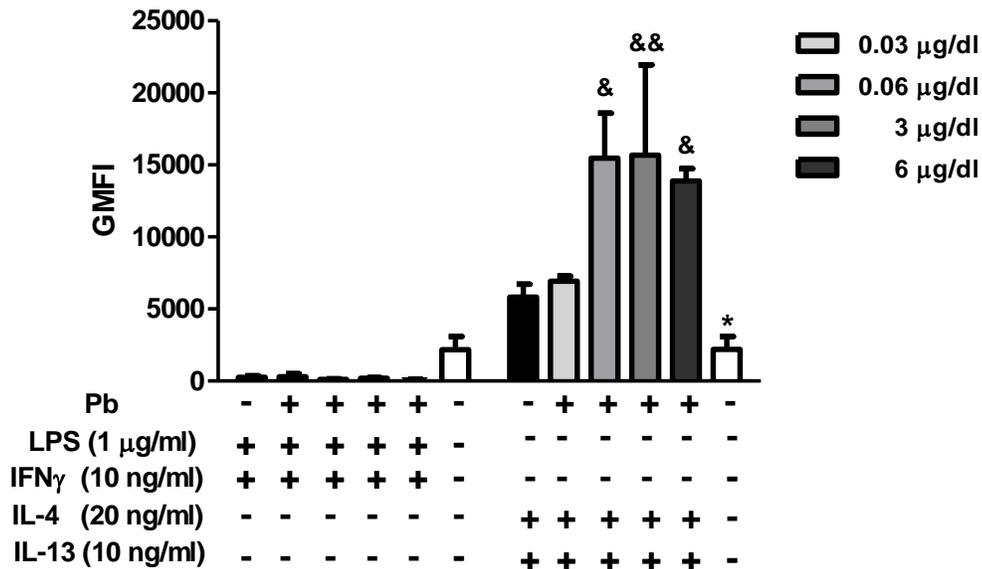


Figura 14. El Pb aumentó la expresión de moléculas de TGF β 1 en los BMDM estimulados al fenotipo anti-inflamatorio sin afectarla en el fenotipo inflamatorio a las 72 h. En **a**, las barras representan la media \pm SEM de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GMFI) de TGF- β 1 y en **b**, se presentan los histogramas de la GMFI de TGF- β 1 en los BMDM de tres experimentos independientes. $^*p \leq 0.05$, $^{\&}p \leq 0.01$ Células tratadas con Pb y activadas con IL-4+IL-13 vs. células solo activadas con IL-4+IL-13. Se analizó por ANOVA de dos vías, *post hoc* Bonferroni y t de Student.

a



b

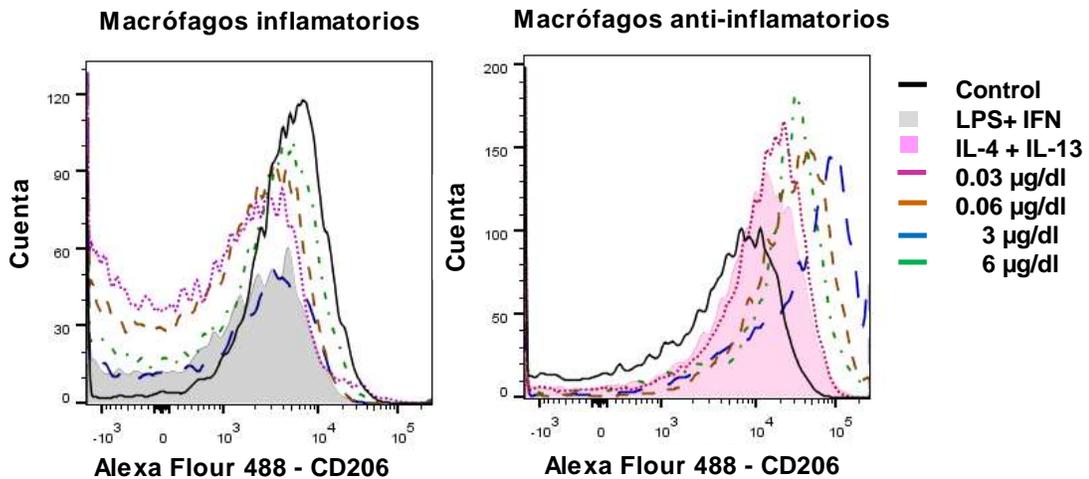


Figura 15. El Pb aumentó la expresión de moléculas de TGF β 1 y receptor de manosa (CD206) en los BMDM estimulados al fenotipo anti-inflamatorio sin afectarla en el fenotipo inflamatorio a las 72 h. En **a**, las barras representan la media \pm SEM de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (GMFI) de CD206 y en **b**, se presentan los histogramas de la GMFI de CD206 de tres experimentos independientes. $\&p \leq 0.005$, $\&\&p \leq 0.01$ Células tratadas con Pb y activadas con IL-4+IL-13 vs. células activadas con IL-4+IL-13; $\ast p \leq 0.05$ Células activadas con IL-4+IL-13 vs. células no tratadas (control). Se analizó por ANOVA de dos vías, *post hoc* Bonferroni y t de Student.

4 DISCUSION

Este trabajo se enfocó en establecer el efecto de concentraciones bajas de Pb (≤ 6 $\mu\text{g/dL}$), es decir aquellas concentraciones que se encuentran en población expuesta ambientalmente, sobre parámetros específicos de los fenotipos inflamatorio y anti-inflamatorio de los macrófagos, efectos que podrían explicar el mayor riesgo en el desarrollo de algunas enfermedades que se reportan en la población expuesta a Pb (Kim *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2020). En este sentido, los macrófagos del fenotipo inflamatorio tienen un papel importante en las enfermedades ocasionadas por diferentes patógenos debido a la producción de ROS y NOS. Un efecto negativo de Pb sobre la producción de NO^{\bullet} es la reducción de la respuesta inmunitaria contra diferentes patógenos intracelulares, como los que se reportan en diferentes modelos animales (Dietert & Piepenbrink, 2006). Por otro lado, el aumento en la actividad del fenotipo anti-inflamatorio de los macrófagos, por ejemplo en la expresión de TGF- β 1 y del receptor de manosa podría estar relacionada con el aumento en el riesgo de presentar enfermedades alérgicas como el asma, las cuales se han reportado en poblaciones expuestas a Pb (Joseph *et al.*, 2005).

Las concentraciones de Pb que se utilizaron en este estudio estuvieron en un rango de 0.03 a 6 $\mu\text{g/dL}$; las concentraciones más altas que se utilizaron se encuentran alrededor del límite máximo permisible de PbS en niños y mujeres embarazadas (5 $\mu\text{g/dL}$) establecido por los CDC (CDC, 2021). También se encuentra cercano al valor que establece la NOM-199-SSA1-2000 en nuestro país. Las concentraciones más bajas que se utilizaron se eligieron considerando la toxicocinética del Pb, ya que del total del Pb que ingresa al organismo, solamente el 1% se encuentra disponible en el plasma. Todas las concentraciones de Pb que se utilizaron se han reportado previamente en sangre de poblaciones infantiles de Japón y Taiwan expuestas ambientalmente (Krueger & Wade, 2016; Tatsuta *et al.*, 2020). Sin embargo, los niveles de PbS en la población infantil mexicana reportados recientemente por Téllez-Rojo y col. (2019) aún se encuentran por encima de 5 $\mu\text{g/dL}$ (prevalencia de 21.8%), con niveles que se asocian con

discapacidades intelectuales en el sistema nervioso, anemia y alteraciones de la función de células del sistema inmune, entre otros (Mitra *et al.*, 2017).

Los BMDM se obtuvieron de ratones BALB/c porque es una de las cepas más utilizadas en la investigación sobre inmunología y enfermedades infecciosas. El rasgo distintivo de la respuesta del BALB/c a tantos tipos de infecciones es la susceptibilidad (Nakamura, 2013). Se ha reportado que los ratones BALB/c producen preferencialmente ornitina, por lo que los BMDM provenientes de esta cepa de ratones se considera que son predominantemente de respuesta tipo Th2 y con características anti-inflamatorias (Mills *et al.*, 2000). Es importante mencionar que los BMDM producen niveles altos de citocinas anti-inflamatorias como TGF- β y tienen una capacidad fagocítica mejor comparada con la de macrófagos peritoneales o de bazo, características que hacen a este modelo experimental ideal para evaluar, además del fenotipo inflamatorio, el fenotipo anti-inflamatorio (Wang *et al.*, 2013). Adicionalmente, en estudios de interacción huésped-patógeno, la respuesta de BMDM es más rápida e intensa (en términos de niveles de genes expresados y la magnitud de la de inducción) en comparación con diferentes líneas celulares de macrófagos (Andreu *et al.*, 2017).

Para determinar la relación entre los efectos del Pb en los fenotipos inflamatorio y antiinflamatorio, consideramos tres características. 1) Los productos obtenidos de las dos vías metabólicas de la L-Arg que ejercen una retroalimentación negativa sobre ambos fenotipos (figura 16). El NO^{*} y la L-citrulina son metabolizados por la iNOS en macrófagos inflamatorios, mientras que la urea y la L-ornitina son sintetizadas por la Arg 1 en los macrófagos anti-inflamatorios (Durante *et al.*, 2007; Mori & Gotoh, 2004) . 2) Las citocinas producidas y 3) los marcadores específicos de membrana sobre-expresados por cada fenotipo también participan en la regulación del otro fenotipo de macrófagos (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014).

Nuestros datos apoyan que el Pb afecta tanto a los macrófagos inflamatorios como a los anti-inflamatorios; el efecto sobre los macrófagos inflamatorios no depende de la retroalimentación negativa resultante del efecto positivo del Pb

sobre el fenotipo anti-inflamatorio. No obstante, apoyan el efecto específico del Pb sobre cada fenotipo. Estos resultados pueden ser debidos a la alteración por parte del Pb sobre moléculas específicas implicadas en la producción de NO[•], la expresión/transporte del MHC II, el receptor de manosa y el TGF-β1. El efecto inhibitorio del Pb sobre la producción de NO[•] encontrado en este estudio concuerda con datos previos publicados en macrófagos de la línea celular J774A.1 activados con LPS y expuestos a 0.05-5 µg/dL de Pb (Luna *et al.*, 2012) y en monocitos de sangre periférica de niños (activados con LPS+IFN γ); en este último estudio se encontró una asociación negativa de la producción de NO[•] con la concentración de PbS (Pineda-Zavaleta *et al.*, 2004). El mecanismo por el cual el Pb disminuye la producción de NO[•] no ha sido descrito completamente. A concentraciones elevadas de Pb (100 and 500 µmol/L ó 2072 and 10360 µg/dL de Pb) se disminuyen los niveles de mRNA y de la proteína de iNOS en las líneas celulares de microglía BV-2 y macrófagos RAW 264.7, ambos estimulados con LPS (Dörpinghaus *et al.*, 2016).

Para explorar un posible mecanismo implicado en el efecto de concentraciones bajas de Pb sobre la producción de NO[•], determinamos el efecto del Pb sobre los niveles proteicos de iNOS. El Pb no modificó la expresión proteica de iNOS, lo que sugiere que la disminución del NO[•] por el Pb en los macrófagos inflamatorios puede ser atribuible a que el Pb interfiere en la función de la iNOS. En este sentido, la toxicidad del Pb es principalmente atribuible a la alteración en la función de diversas biomoléculas debido a la unión de este metal en sus sitios activos o por la generación de modificaciones estructurales (Souza *et al.*, 2018). Las perturbaciones en la actividad de enzimas o proteínas puede ocurrir debido a que éstas presentan en su estructura metales divalentes como Zn²⁺ y Ca²⁺, los cuales son desplazados por el Pb, el cual también se une con alta afinidad al grupo tiol (SH), o a grupos carboxilo o carbonilo (Maret, 2017). Es importante mencionar que la enzima iNOS tiene un grupo hemo responsable de la oxidación de L-Arg, además de un grupo tiolato-Zn²⁺ necesario para unión de BH₄ (tetrahidrobiopterina) y de L-Arg (Förstermann & Sessa, 2012) Por lo tanto, es

posible que el Pb interfiera con la función de la iNOS sustituyendo al Zn^{2+} y en consecuencia afectando la producción de NO^* .

En macrófagos inflamatorios, nuestros resultados muestran que el Pb no altera la expresión de $TNF-\alpha$ o $IL-1\beta$, dos mediadores de la respuesta inflamatoria contra patógenos. Al momento no se dispone de datos publicados sobre el efecto del Pb en la secreción de $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$ por macrófagos inducidos al perfil inflamatorio con LPS + $IFN\gamma$, ya que este esquema de inflamación es más similar a las condiciones fisiológicas de activación de macrófagos presentes en diferentes condiciones patológicas en un organismo. Sin embargo, brevemente se mencionan resultados previos obtenidos en macrófagos activados solo con LPS en donde solamente se activa la vía liderada por $NF-\kappa B$. En macrófagos J744A.1 estimulados con LPS, 5 $\mu g/dL$ de Pb incrementó la secreción de $TNF-\alpha$ (Luna *et al.*, 2012) y en ratones A/J expuestos a una dosis alta de Pb (5 mg/kg) y estimulados con LPS se sobre-indujo la expresión de $TNF-\alpha$ en macrófagos de sangre total y de peritoneo, pero la administración de Pb y LPS por separado aumentó solo ligeramente la expresión de $TNF-\alpha$ (Cheng *et al.*, 2006). En macrófagos de la línea celular J774A.1 estimulados con LPS, el tratamiento con 0.5 y 5 $\mu g/dL$ de Pb incrementó la secreción de $IL-1\beta$ (Luna *et al.*, 2012).

En los BMDM activados con LPS+ $IFN\gamma$ encontramos que la incubación con 3 y 6 $\mu g/dL$ de Pb aumentó la expresión de MHC II en membrana, una molécula típicamente encontrada solo en células presentadoras de antígeno y esencial para la activación de los linfocitos Th1. A concentraciones altas de Pb (2.5 y 5.0 μM , equivalente a 51.5 y 103.2 $\mu g/dL$) y (25 $\mu M = 518 \mu g/dL$), se indujo un aumento en la expresión de MHC II en macrófagos RAW 267.4 y en los BMDM no estimulados, respectivamente (Gao *et al.*, 2007; Kerr *et al.*, 2013). Es importante mencionar que la expresión de MHC II en la superficie de las células no activadas al perfil inflamatorio, es limitada. El aumento en la expresión de MHC II en la membrana, depende de la formación de un complejo estable MHC II-péptido antigénico (Jurewicz & Stern, 2019) y la unión de MHC II-péptido involucra la participación de proteasas lisosomales como catepsinas B, S y L, las cuales tienen una

participación crucial desde el procesamiento de antígeno en vesículas, hasta la asociación del antígeno peptídico a las moléculas de MHC II en los endosomas (Kitamura *et al.*, 2005). En este sentido, evidencias muestran que el Pb incrementa la expresión y actividad de catepsina B en neuronas de hipocampo (1.83 $\mu\text{g/g}$ de Pb) y en células de pulmón de ratas (inhalación de 0.01% acetato de Pb), respectivamente (Likholat *et al.*, 1999; Wei-feng *et al.*, 2012). Debido a que las catepsinas B, S y L tienen cisteína en su sitio activo (Vidak *et al.*, 2019), es posible que el Pb pueda unirse a éstas aumentando su actividad. Sin embargo, se requieren más estudios para poder elucidar la capacidad del Pb para unirse a la cisteína en el sitio activo de las catepsinas y eventualmente inducir su expresión a través de la regulación de genes que pudieran ser dependientes de Zn^{2+} .

Los resultados mostraron que el Pb en los BMDM activados hacia ambos fenotipos, no afectó la expresión de CD86, una molécula co-estimuladora que interactúa con CD28 o CTL4 en las células T como una señal requerida para su activación o regulación (Manzotti *et al.*, 2006). Estudios previos no han evaluado el efecto del Pb sobre CD86 en macrófagos activados con LPS+IFN γ , sin embargo nuestros datos coinciden con resultados en los BMDM expuestos a 1-25 μM de cloruro de Pb y estimulados con LPS (Gao *et al.*, 2007).

Los datos obtenidos en macrófagos inflamatorios sugieren que la inhibición de NO^{\bullet} por el Pb podría disminuir la respuesta de los macrófagos contra infecciones, ya que el NO^{\bullet} es importante para hacer frente a las enfermedades infecciosas causadas por bacterias intracelulares (Chakravorty & Hensel, 2003). Por otro lado, el aumento en la expresión de las moléculas MHC II podría estar incrementando la presentación de antígenos a las células T, pero también es necesario un aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras (Jurewicz & Stern, 2019), efecto que el Pb no generó. Es necesario llevar a cabo más estudios en presencia de macrófagos y linfocitos para corroborar este efecto sugerido por el Pb.

En los BMDM anti-inflamatorios el Pb indujo un aumento de la expresión de TGF- β 1, aunque el mecanismo por el cual el Pb incrementa la expresión de TGF- β 1

aún no ha sido definido. Teniendo en cuenta la importante participación de la furina, una endoproteasa dependiente de Ca^{+2} , en el procesamiento y activación de TGF- β para ser capaz de unirse y activar a los receptores TGF- β RI y TGF- β RII (Solovyeva *et al.*, 2017), consideramos importante que en estudios futuros se evalúe el efecto del Pb sobre esta endoproteinasa, como un posible mecanismo involucrado en la regulación positiva de TGF- β a bajas concentraciones de Pb en macrófagos anti-inflamatorios.

La sobre-expresión del receptor de manosa (CD206) inducida por el Pb en los BMDM anti-inflamatorios, que observamos en el presente trabajo, es consistente con datos en ratas expuestas intravenosamente a nitrato de Pb (10 mmol/100 g de peso corporal) por 30 días, en las cuales se encontró un incremento en la expresión de los sitios de unión a manosa en células de Kupffer (Ruzittu *et al.*, 1999). Por otro lado, el Pb incrementa la expresión y la unión al ADN del factor de transcripción SP1 (una proteína con estructura de dedos de Zn^{2+}), en el hipocampo de ratas expuestas posnatalmente a 0.2% de acetato de Pb en el agua de bebida (Basha *et al.*, 2003). Lo interesante de este antecedente es que la transcripción del gen del receptor de manosa es regulado por la unión de los factores de transcripción PU.1 y SP1 que potencian la actividad del promotor (Eichbaum *et al.*, 1997). Con esta consideración, es posible que uno de los mecanismos relacionados con la capacidad del Pb para inducir la sobre-expresión del receptor de manosa, esté asociada al efecto de este metal sobre SP1.

Los resultados obtenidos en BMDM anti-inflamatorios sugieren que el aumento en la expresión de TGF- β 1 inducido por el Pb podría relacionarse con patologías como la fibrosis y el asma; ya que la sobre-expresión de TGF- β se asocia con el depósito anormal de la matriz extracelular que conduce a estos procesos (Chen *et al.*, 2018; Isaka, 2018). Sin embargo, en el caso del asma, el TGF- β promueve la diferenciación de las células Th17 contribuyendo al reclutamiento de neutrófilos en las vías respiratorias y a la inflamación eosinofílica mediada por células Th2 (Saito *et al.*, 2018). Mientras que el aumento del receptor de manosa está relacionado con la inflamación alérgica y el asma (Hattori *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2018). En

monocitos circulantes de individuos con rinitis alérgica se encontró una alteración fenotípica caracterizada por el aumento de marcadores anti-inflamatorios como la expresión del receptor de manosa (Moniuszko *et al.*, 2013). Esta misma alteración en la expresión del receptor de manosa se presenta en macrófagos de lavado broncoalviolar de sujetos con asma (Girodet *et al.*, 2016). En este sentido, varios estudios han informado de que la exposición al Pb en los seres humanos está relacionada con las alergias como el asma (Hsiao *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017).

En conclusión, nuestros resultados mostraron por primera vez que concentraciones ambientalmente relevantes de Pb alteran los parámetros funcionales o los marcadores fenotípicos de anti-inflamación, además de los efectos sobre los macrófagos inflamatorios (figura 16). Este estudio muestra que los efectos del Pb sobre los macrófagos inflamatorios no dependen de la retroalimentación negativa resultante del efecto del Pb sobre el fenotipo anti-inflamatorio. Por último, los datos indican que el Pb no interfiere en la vía de activación hacia ambos fenotipos de macrófagos, sino que afecta sólo a algunas moléculas o vías específicas relacionadas con ellas. No obstante, quedan por estudiar los mecanismos moleculares por los que el Pb afecta blancos específicos en los macrófagos inflamatorios o anti-inflamatorios. Nuestros hallazgos pueden explicar la disminución de la respuesta frente a los patógenos intracelulares y la susceptibilidad a las enfermedades alérgicas observada en los sujetos expuestos al Pb (Krueger & Wade, 2016; Wang *et al.*, 2017).

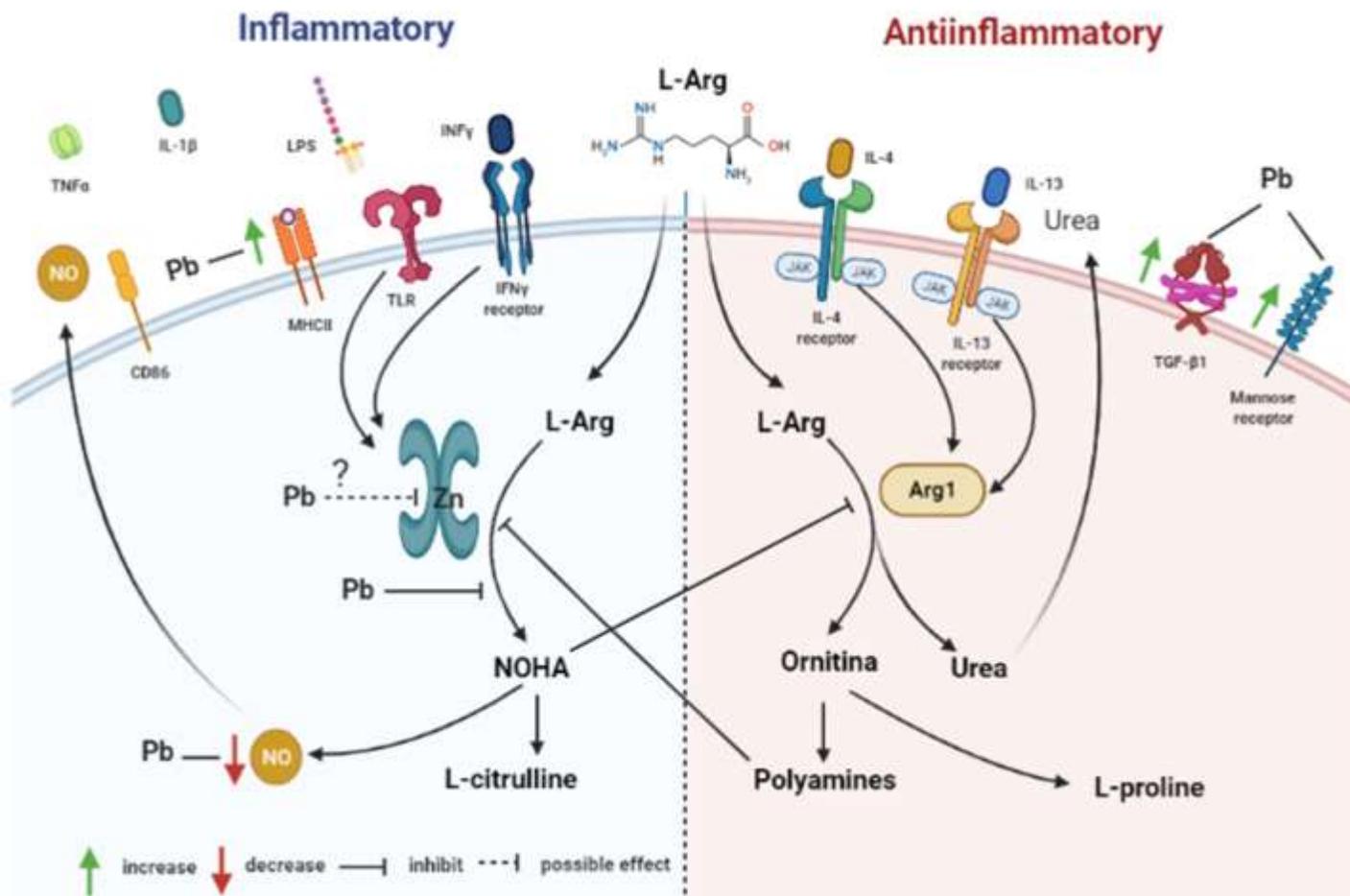


Figura 16. Alteraciones inducidas por el Pb en mediadores funcionales de macrófagos inflamatorios y anti-inflamatorios.

5 CONCLUSIONES

1. A concentraciones ambientalmente relevantes, el Pb alteró tanto el fenotipo inflamatorio como el anti-inflamatorio de los BMDM.
2. El Pb (6 $\mu\text{g/dL}$) inhibió la producción de NO^* sin afectar los niveles de iNOS ni de la actividad de Arg 1 en los BMDM estimulados al fenotipo inflamatorio, sugiriendo que el Pb afecta la producción de NO^* a través de la alteración de la estructura y función de iNOS.
3. El Pb (3 y 6 $\mu\text{g/dL}$) aumentó la expresión de MHC II, sin afectar los niveles de CD86 ni alterar la producción ni secreción de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ en los BMDM estimulados al fenotipo inflamatorio. MHC II y CD86 no fueron alterados por el Pb en los BMDM anti-inflamatorios. Esto sugiere que el Pb no afecta la vía completa de activación hacia el perfil inflamatorio y tampoco altera algún marcador inflamatorio de los BMDM activados al perfil anti-inflamatorio.
4. El Pb (0.06, 3 y 6 $\mu\text{g/dL}$) aumentó la expresión de $\text{TGF-}\beta 1$ y del receptor de manosa sin afectar la actividad de Arg 1 en los BMDM estimulados al perfil anti-inflamatorio. El Pb no afectó estos mismos marcadores en los BMDM estimulados al fenotipo inflamatorio. Lo anterior sugiere que el Pb no favorece la activación de vía completa hacia el perfil anti-inflamatorio y tampoco la alteración de los marcadores anti-inflamatorios en los BMDM activados al perfil inflamatorio.
5. Los efectos del Pb sobre los macrófagos inflamatorios no son el resultado de la regulación positiva de los marcadores de fenotipo anti-inflamatorio, lo que sugiere una alteración sobre blancos específicos del fenotipo inflamatorio.
6. Los datos sugieren que el efecto del Pb sobre los macrófagos de ambos fenotipos no es el resultado de la alteración en las vías de activación de fenotipo contrario.
7. Las evidencias apoyan que los efectos observados en cada fenotipo son el resultado del efecto del Pb sobre moléculas o vías específicas relacionados con las moléculas alteradas.

6 PERSPECTIVAS

Los mecanismos moleculares por los cuales el Pb afecta a un marcador específico en los macrófagos inflamatorios y anti-inflamatorios deben ser motivo de estudios futuros, enfocándose entre otras cosas a:

1. Evaluar el efecto del Pb sobre la estructura de iNOS, lo cual pudiera alterar la función la enzima.
2. Determinar el efecto del Pb sobre la expresión y actividad de catepsinas B, S y L implicadas en el procesamiento y asociación de péptidos al MHC II.
3. Estudiar el efecto del Pb sobre la presentación de antígenos por los BMDM y células dendríticas.
4. Determinar el efecto del Pb sobre la actividad de furina, necesaria para la escisión y activación de TGF- β 1
5. Evaluar el efecto del Pb sobre la estructura y unión de SP1 a ADN, factor de transcripción que regula la expresión del receptor de manosa.
6. Determinar el efecto del Pb en BMDM de una cepa de ratón singénica, como la C57BL/6, con características Th1 y contrastar sus efectos con los obtenidos en este trabajo en BMDM de ratones BALB/c, que presenta características Th2.

7 REFERENCIAS

- Abbas Abul K.; Lichtman Andrew H.; Pillai Shiv. (2015). *Cellular and Molecular Immunology* (8va ed.). Elsevier.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2016). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Ahamed, M., & Siddiqui, M. K. J. (2007). Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clinica Chimica Acta*, 383(1–2), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.024>
- Andreu, N., Phelan, J., De Sessions, P. F., Cliff, J. M., Clark, T. G., & Hibberd, M. L. (2017). Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with Mycobacterium tuberculosis. *Scientific Reports*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep42225>
- ATSDR. (2007). Toxicological Profile for Lead. *U.S Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, (August), 582. Retrieved from <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>
- Ballatori, N. (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environmental Health Perspectives*, 110(SUPPL. 5), 689–694.
- Basha, R., Wei, W., Brydie, M., Razmiafshari, M., & Zawia, N. H. (2003). Lead-induced developmental perturbations in hippocampal Sp1 DNA-binding are prevented by zinc supplementation: in vivo evidence for Pb and Zn competition. *Int. J. Devl Neuroscience*, 21(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(02\)00137-5](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(02)00137-5)
- Carocci A, Catalano A, Lauria G, Sinicropi MS, G. G. (2014). Lead Toxicity, Antioxidant Defense and Environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 238, 45–67.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021). Recommended Actions Based on Blood Lead Level. Retrieved from <https://www.cdc.gov/nceh/lead/advisory/acclpp/actions-blls.htm>
- Chakravorty, D., & Hensel, M. (2003). Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and Infection*, 5(7), 621–627. [https://doi.org/doi:10.1016/s1286-4579\(03\)00096-0](https://doi.org/doi:10.1016/s1286-4579(03)00096-0).
- Chavez-Galvan, L., Olleros, M. L., Vesin, D., & Garcia, I. (2015). Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. *Frontiers in Immunology*, 6(MAY), 263. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00263>
- Chen, S., Han, Y., Chen, H., Wu, J., & Zhang, M. (2018). Bcl11b regulates IL-17 through the TGF- β /Smad pathway in HDM-induced Asthma. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 10(5), 543–554. <https://doi.org/10.4168/aair.2018.10.5.543>

- 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. <https://doi.org/10.1289/ehp.8550>
- Committee on Measuring Lead in Critical Populations, N. R. C. (US). (1993). Biologic Markers of Lead Toxicity. In *Measuring Lead Exposure in Infants, Children, and Other Sensitive Populations*. Washington (DC): National Academies Press (US). <https://doi.org/10.17226/2232>
- Cook, J. A., Hoffmann, E. O., & Luzio, N. R. (1975). Influence of Lead and Cadmium on the Susceptibility of Rats to Bacterial Challenge. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 150(3), 741–747. <https://doi.org/10.3181/00379727-150-39117>
- Corraliza, I. M., Campo, M. L., Soler, G., & Modolell, M. (1994). Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods*, 174(1–2), 231–235. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90027-2)
- Dietert, R. R., & Piepenbrink, M. S. (2006). Lead and Immune Function. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(4), 359–385. <https://doi.org/10.1080/10408440500534297>
- Dobrakowski, M., Boroń, M., Czuba, Z. P., Kasperczyk, A., Machoń-Grecka, A., & Kasperczyk, S. (2016). Cytokines related to three major types of cell-mediated immunity in short- and long-term exposures to lead compounds. *Journal of Immunotoxicology*, 13(6), 770–774. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2016.1184360>
- Dörpinghaus, M., Brieger, A., Panichkina, O., Rink, L., & Haase, H. (2016). Lead ions abrogate lipopolysaccharide-induced nitric oxide toxicity by reducing the expression of STAT1 and iNOS. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 37, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.04.009>
- Durante, W., Johnson, F. K., & Johnson, R. A. (2007). Arginase: A critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04638.x>
- Dyatlov, V. A., & Lawrence, D. A. (2002). Neonatal lead exposure potentiates sickness behavior induced by *Listeria monocytogenes* infection of mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 16(4), 477–492. <https://doi.org/10.1006/brbi.2001.0641>
- Eichbaum, B. Q., Heney, D., Raveh, D., Chung, M., Davidson, M., Epstein, J., & Ezekowitz, R. A. B. (1997). Murine Macrophage Mannose Receptor Promoter Is Regulated by the Transcription Factors PU.1 and SP1. *Blood*, 90(10), 4135–4143.
- Eichhorn, G. L. (1976). Active Sites of Biological Macromolecules and Their Interaction with Heavy Metals. In *Ecological Toxicology Research* (1st ed., pp.

123–142). Springer US.

- EPA. (2017). Learn about lead. Retrieved from www.epa.gov/lead/learn-about-lead#lead
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829-37, 837a-837d. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, 4(3), 281-6. <https://doi.org/10.2174/1568010054022024>
- Gao, D., Mondal, T. K., & Lawrence, D. A. (2007). Lead effects on development and function of bone marrow-derived dendritic cells promote Th2 immune responses. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222(1), 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.04.001>
- García-Lestón, J., Roma-Torres, J., Mayan, O., Schroecksnadel, S., Fuchs, D., Moreira, A. O., ... Laffon, B. (2012). Assessment of Immunotoxicity Parameters in Individuals Occupationally Exposed to Lead. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 75(13–15), 807–818. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.690327>
- Garza, A., Vega, R., & Soto, E. (2006). Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med Sci Monit*, 12(3), RA57-A65.
- Ghering, A. B., Jenkins, L. M. M., Schenck, B. L., Deo, S., Mayer, R. A., Pikaart, M. J., ... Godwin, H. A. (2005). Spectroscopic and functional determination of the interaction of Pb 2+ with GATA proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 127(11), 3751–3759. <https://doi.org/10.1021/ja0464544>
- Girard, T., Gaucher, D., El-far, M., Breton, G., & Sékaly, R. (2014). CD80 and CD86 IgC domains are important for quaternary structure, receptor binding and co-signaling function. *Immunology Letters*, 161(1):65-75. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.05.002>
- Girodet, P. O., Nguyen, D., Mancini, J. D., Hundal, M., Zhou, X., Israel, E., & Cernadas, M. (2016). Alternative macrophage activation is increased in asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 55(4), 467–475. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0295OC>
- Gong, D., Shi, W., Yi, S., Chen, H., Groffen, J., & Heisterkamp, N. (2012). TGF β signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunology*, 13(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-13-31>
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1), 131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Gupta, P., Husain, M. M., Shankar, R., Seth, P. K., & Maheshwari, R. K. (2002). Lead exposure enhances virus multiplication and pathogenesis in mice. *Veterinary and Human Toxicology*, 44(4), 205–210.

- Hanas, J. S., Rodgers, J. S., Bantle, J. A., & Cheng, Y. G. (1999). Lead inhibition of DNA-binding mechanism of Cys2His2 zinc finger proteins. *Molecular Pharmacology*, *56*(5), 982–988. <https://doi.org/10.1124/mol.56.5.982>
- Hattori, T., Konno, S., Hizawa, N., Isada, A., Takahashi, A., Shimizu, K., ... Nishimura, M. (2009). Genetic variants in the mannose receptor gene (MRC1) are associated with asthma in two independent populations. *Immunogenetics*, *61*(11–12), 731–738. <https://doi.org/10.1007/s00251-009-0403-x>
- Heideveld, E., & van den Akker, E. (2017). Digesting the role of bone marrow macrophages on hematopoiesis. *Immunobiology*, *222*(6), 814–822. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.11.007>
- Hemdan, N. Y. A., Emmrich, F., Adham, K., Wichmann, G., Lehmann, I., El-Massry, A., ... Sack, U. (2005). Dose-dependent modulation of the in vitro cytokine production of human immune competent cells by lead salts. *Toxicological Sciences*, *86*(1), 75–83.
- Hemphill, F. E., Kaeberle, M. L., & Buck, W. B. (1971). Lead suppression of mouse resistance to *Salmonella typhimurium*. *Science*, *172*(3987), 1031–1032. <https://doi.org/10.1126/science.172.3987.1031>
- Heo, Y., Lee, B. K., Ahn, K. D., & Lawrence, D. A. (2004). Serum IgE elevation correlates with blood lead levels in battery manufacturing workers. *Human and Experimental Toxicology*, *23*(5), 209–213.
- Heo, Y., Lee, W. T., & Lawrence, D. A. (1998). Differential effects of lead and cAMP on development and activities of Th1- and Th2-lymphocytes. *Toxicological Sciences*, *43*(2), 172–185.
- Holling, T. M., Schooten, E., & Van Den Elsen, P. J. (2004). Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: Of mice and men. *Human Immunology*, *65*(4), 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.01.005>
- Hsiao, C.-L. L., Wu, K.-H. H., & Wan, K.-S. S. (2011). Effects of environmental lead exposure on T-helper cell-specific cytokines in children. *Journal of Immunotoxicology*, *8*(4), 284–287. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2011.592162>
- IARC. (2006). Inorganic and Organic Lead Compounds. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, *87*.
- Isaka, Y. (2018). Targeting TGF- β signaling in kidney fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9):2532. <https://doi.org/10.3390/ijms19092532>
- Jablonski, K. A., Amici, S. A., Webb, L. M., Ruiz-Rosado, J. D. D., Popovich, P. G., Partida-Sanchez, S., & Guerau-De-arellano, M. (2015). Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. *PLoS ONE*, *10*(12), 5–11.
- Jan, A. T., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I., & Haq, Q. M. R. (2015). Heavy metals and human health: Mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 29592–29630. <https://doi.org/10.3390/ijms161226183>

- Jang, W. H., Lim, K. M., Kim, K., Noh, J. Y., Kang, S., Chang, Y. K., & Chung, J. H. (2011). Low level of lead can induce phosphatidylserine exposure and erythrophagocytosis: A new mechanism underlying lead-associated anemia. *Toxicological Sciences*, *122*(1), 177–184. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr079>
- Joseph, C. L. M., Havstad, S., Ownby, D. R., Peterson, E. L., Maliarik, M., McCabe, M. J., ... Johnson, C. C. (2005). Blood lead level and risk of asthma. *Environmental Health Perspectives*, *113*(7), 900–904. <https://doi.org/10.1289/ehp.7453>
- Jurewicz, M. M., & Stern, L. J. (2019). Class II MHC antigen processing in immune tolerance and inflammation. *Immunogenetics*, *71*(3), 171–18. <https://doi.org/10.1007/s00251-018-1095-x>
- Kasten-Jolly, J., & Lawrence, D. A. (2014). Lead Modulation of Macrophages Causes Multiorgan Detrimental Health Effects. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *28*(8), 355–372.
- Kerr, R. P., Krunkosky, T. M., Hurley, D. J., Cummings, B. S., Holladay, S. D., & Gogal, R. M. (2013). Lead at 2.5 and 5.0 μ M induced aberrant MH-II surface expression through increased MII exocytosis and increased autophagosome formation in Raw 267.4 cells. *Toxicology in Vitro*, *27*(3), 1018–1024. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.01.018>
- Kim, M. G., Ryoo, J. H., Chang, S. J., Kim, C. B., Park, J. K., Koh, S. B., & Ahn, Y. S. (2015). Blood lead levels and cause-specific mortality of inorganic lead-exposed workers in South Korea. *PLoS ONE*, *10*(10), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140360>
- Kirberger, M., & Yang, J. (2008). Structural Differences Between Pb²⁺ - and Ca²⁺ -binding Sites in Proteins: Implications with Respect to Toxicity. *Journal Inorganic Biochemical*, *102*(10), 1901–1909. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.06.014>.Structural
- Kishikawa, H., Song, R., & Lawrence, D. a. (1997). Interleukin-12 promotes enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* infection of lead-exposed mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *147*(2), 180–189. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8308>
- Kitamura, H., Kamon, H., Sawa, S. I., Park, S. J., Katunuma, N., Ishihara, K., ... Hirano, T. (2005). IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II $\alpha\beta$ dimer level through cathepsin S activity in Dendritic Cells. *Immunity*, *23*(5), 491–502. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.09.010>
- Knowles, S. O., & Donaldson, W. E. (1997). Lead disrupts eicosanoid metabolism, macrophage function, and disease resistance in birds. *Biological Trace Element Research*, *60*(1–2), 13–26.
- Kowolenko, M., Tracy, L., & Lawrence, D. (1991). Early effects of lead on bone marrow cell responsiveness in mice challenged with *Listeria monocytogenes*. *Toxicological Sciences*, *17*(1), 75–82. <https://doi.org/10.1093/toxsci/17.1.75>
- Krueger, W. S., & Wade, T. J. (2016). Elevated blood lead and cadmium levels associated with chronic infections among non-smokers in a cross-sectional

- analysis of NHANES data. *Environmental Health*, 15(16), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0113-4>
- Lawrence, D. A. (1981). In vivo and in vitro effects of lead on humoral and cell-mediated immunity. *Infection and Immunity*, 31(1), 136–143.
- Lawrence, T., & Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 750–761.
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51(12), 2415–2418. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>
- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K. L., & Flavell, R. A. (2006). Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 24, 99–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737>
- Li, S., Zhengyan, Z., Rong, L., & Hanyun, C. (2005). Decrease of CD4+ T-Lymphocytes in Children Exposed to Environmental Lead. *Biological Trace Element Research*, 105(1–3), 019–026.
- Likholat, A., Anan'eva, T., Antoniuk, S., Lutova, N. (1999). Proteolytic system in lungs upon inhalation exposure to low doses of lead salts. *Ukr Biokhim Zh*, 72(6), 84–87.
- Liu, J., Goyer, R. A., & Waalkes, M. P. (2013). Toxic Effects of Metals. In *Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons* (Seventh ed, Vol. 12, pp. xv, 1310 p., [1] leaf of plates). <https://doi.org/10.1036/0071470514>
- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Cytokine & Growth Factor Reviews Understanding the mechanism of IL-1 b secretion. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 22(4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- Luna, A. L., Acosta-Saavedra, L. C., Martínez, M., Torres-Avilés, N., Gómez, R., & Calderón-Aranda, E. S. (2012). TLR4 is a target of environmentally relevant concentration of lead. *Toxicology Letters*, 214(3), 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.09.009>
- Manzanero, S. (2012). Generation of mouse bone marrow-derived macrophages. *Methods in Molecular Biology*, 844, 177–181. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-527-5_12
- Manzotti, C. N., Liu, M. K. P., Burke, F., Dussably, L., Zheng, Y., & Sansom, D. M. (2006). Integration of CD28 and CTLA-4 function results in differential responses of T cells to CD80 and CD86. *European Journal of Immunology*, 36(6), 1413–1422. <https://doi.org/10.1002/eji.200535170>
- Maret, W. (2017). The bioinorganic chemistry of lead in the context of its toxicity. In *Lead: Its Effects on Environment and Health* (Vol. 17, pp. 1–20). <https://doi.org/10.1515/9783110434330-001>
- Martinez-Pomares, L. (2012). The mannose receptor. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(6), 1177–1186. <https://doi.org/10.1189/jlb.0512231>

- Mcwhorter, F. Y., Wang, T., Nguyen, P., Chung, T., & Liu, W. F. (2013). Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17253–17258.
- Metryka, E., Kupnicka, P., Kapczuk, P., Aszakiewicz, B., Piotrowska, K., Tkacz, M., ... Baranowska-Bosiacka, I. (2021). Lead (Pb) Accumulation in Human THP-1 Monocytes/Macrophages In Vitro and the Influence on Cell Apoptosis. *Biological Trace Element Research*, 199(3), 955–967. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02215-7>
- Metryka, E., Kupnicka, P., Kapczuk, P., Simińska, D., Tarnowski, M., Goschorska, M., ... Baranowska-Bosiacka, I. (2020). Lead (Pb) as a factor initiating and potentiating inflammation in human THP-1 macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21062254>
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
- Mishra, K. P. (2009). Lead exposure and its impact on immune system: A review. *Toxicology in Vitro*, 23(6), 969–972.
- Mitra, P., Sharma, S., Purohit, P., & Sharma, P. (2017). Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 54(7-8), 506–528. <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1408562>
- Moniuszko, M., Kowal, K., Jeznach, M., Rusak, M., Dabrowska, M., & Bodzenta-Lukaszyk, A. (2013). Phenotypic correlations between monocytes and CD4+ T cells in allergic patients. *International Archives of Allergy and Immunology*, 161(2), 131–141. <https://doi.org/10.1159/000343687>
- Mori, M., & Gotoh, T. (2004). Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. In *Journal of Nutrition*, 134, 2820–2825. <https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2820s>
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mosser, D., & Edwards, J. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969.
- Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(2), 209–212.
- Musco, F., & van Staden, M. (2010). Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. In *Advances in Global Change Research*, 39, 415–419. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9531-3_7
- Nakamura, H. (2013). *BALB/c Mouse*. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (Vol. 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00133-9>
- Nanda, K. P., Kumari, C., Dubey, M., & Firdaus, H. (2019). Chronic lead (Pb) exposure results in diminished hemocyte count and increased susceptibility to

- bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, 236, 124349. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124349>
- Nevo, Y., & Nelson, N. (2006). The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(7), 609–620. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.007>
- Oh, J., & Shin, J. S. (2015). Molecular mechanism and cellular function of MHCII ubiquitination. *Immunological Reviews*, 266(1), 134–144. <https://doi.org/10.1111/imr.12303>
- Oishi, Y., & Manabe, I. (2018). Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *International Immunology*, 30(11), 511–528. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy054>
- Park, W. J., Kim, S. H., Kang, W. Y., Ahn, J. S., Cho, S., Lim, D. Y., ... Moon, J. D. (2020). Blood lead level and *Helicobacter pylori* infection in a healthy population: A cross-sectional study. *Archives of Environmental and Occupational Health*, 75(6), 333–338. <https://doi.org/10.1080/19338244.2019.1654969>
- Pineda-Zavaleta, A. P., García-Vargas, G., Borja-Aburto, V. H., Acosta-Saavedra, L. C., Vera Aguilar, E., Gómez-Muñoz, A., ... Calderón-Aranda, E. S. (2004). Nitric oxide and superoxide anion production in monocytes from children exposed to arsenic and lead in region Lagunera, Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198(3), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.10.034>
- Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I., & Munder, M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology*, 5, 1–10.
- Ruzittu, M., Carlá, E. C., Montinari, M. R., Maietta, G., & Dini, L. (1999). Modulation of cell surface expression of liver carbohydrate receptors during in vivo induction of apoptosis with lead nitrate. *Cell and Tissue Research*, 298(1), 105–112. <https://doi.org/10.1007/s004419900059>
- Saito, A., Horie, M., & Nagase, T. (2018). TGF- β signaling in lung health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms19082460>
- Sanin, L. H., González-Cossío, T., Romieu, I., & Hernández-Avila, M. (1998). Acumulacion de plomo en hueso y sus efectos en la salud. *Salud Publica de Mexico*, 40(4), 359–368. <https://doi.org/10.1590/s0036-36341998000400009>
- Sarasua, S. M., Vogt, R. F., Henderson, L. O., Jones, P. A., & Lybarger, J. A. (2000). Serum immunoglobulins and lymphocyte subset distributions in children and adults living in communities assessed for lead and cadmium exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, (60), 1–16.
- Schlipkötter HW, F. L. (1979). The influence of short-term lead exposure on the bacterial clearance of the lung. *Zentralbl Bakteriol B.*, 168(3–4), 256–265.
- Sedger, L. M., & McDermott, M. F. (2014). TNF and TNF-receptors: From

- mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 25(4), 453–72. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>
- SEGOB. (2017). Modificación de NOM-199-SSA1-2000. Retrieved from http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5495551&fecha=30/08/2017
- SEGOB. (2021). Salud ambiental Índices biológicos de exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas. Retrieved August 23, 2021, from http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5249877&fecha=06/06/2012
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., ... Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425–6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Simons, T. J. (1993). Lead-calcium interactions in cellular lead toxicity. *Neurotoxicology*, 14(2–3), 77–85.
- Sitia, R., & Rubartelli, A. (2018). The unconventional secretion of IL-1 β : Handling a dangerous weapon to optimize inflammatory responses. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 83, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.03.011>
- Solovyeva, N. I., Gureeva, T. A., Timoshenko, O. S., Moskvitina, T. A., & Kugaevskaya, E. V. (2017). Furin as proprotein convertase and its role in normal and pathological biological processes. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 11(2), 87–100. <https://doi.org/10.1134/S1990750817020081>
- Souza, I. D. De, Andrade, A. S. De, Siqueira, R. J., Dantas de Souza, I., Silveira de Andrade, A., & Juliani, R. (2018). Lead-interacting proteins and their implication in lead poisoning. *Critical Reviews in Toxicology*, 48(5), 375–386. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429387>
- Tatsuta, N., Nakai, K., Kasanuma, Y., Iwai-Shimada, M., Sakamoto, M., Murata, K., & Satoh, H. (2020). Prenatal and postnatal lead exposures and intellectual development among 12-year-old Japanese children. *Environmental Research*, 189, 109844. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109844>
- Téllez-Rojo, M. M., Bautista-Arredondo, L. F., Trejo-Valdivia, B., Cantoral, A., Estrada-Sánchez, D., Kraiem, R., ... Tamayo-Ortiz, M. (2019). Reporte nacional de niveles de plomo en sangre y uso de barro vidriado en población infantil vulnerable. *Salud Pública de México*, 61(6, nov-dic), 787. <https://doi.org/10.21149/10555>
- Tian L, L. D. (1995). Lead inhibits nitric oxide production in vitro by murine splenic macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 132, 156–163.
- Turaç, G., Hindley, C. J., Thomas, R., Davis, J. A., Deleidi, M., Gasser, T., ... Pruszek, J. (2013). Combined Flow Cytometric Analysis of Surface and Intracellular Antigens Reveals Surface Molecule Markers of Human Neutropoiesis. *PLoS ONE*, 8(6), 1–14.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068519>

- Varin, A., & Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. *Immunobiology*, 214(7), 630–641.
- Vidak, E., Javoršek, U., Vizovišek, M., & Turk, B. (2019). Cysteine Cathepsins and their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment. *Cells*, 8(3), 264. <https://doi.org/10.3390/cells8030264>
- Wang, C., Yu, X., Cao, Q., Wang, Y., Zheng, G., Tan, T. K., ... Harris, D. C. H. (2013). Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunology*, 5(14), 6.
- Wang, I. J., Karmaus, W. J., & Yang, C. C. (2017). Lead exposure, IgE, and the risk of asthma in children. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 27(5), 478–483. <https://doi.org/10.1038/jes.2017.5>
- Wang, N., Liang, H., & Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Frontiers in Immunology*, 5(NOV), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>. eCollection 2014
- Wei-feng, Ye , Yun, Tian, Ji-yun, Huang, Mei-hua, Liao, Rong-rong, Tao, Gen-sheng, Zhang, Yi-jia, Lou, Feng, H. (2012). Effect of chronic lead exposure on expression of autophagy-associated proteins in rat hippocampus. *Journal of Zhejiang University. Medical Sciences*, 41(4), 402–409.
- Williams, R. J., Karpuzoglu, E., Connell, H., Hurley, D. J., Holladay, S. D., & Gogal, R. M. (2019). Lead alters intracellular protein signaling and suppresses pro-inflammatory activation in TLR4 and IFNR-stimulated murine RAW 264.7 cells, in vitro. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 82(4), 279–298. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1591315>
- World Health Organization. (2019). Lead poisoning and health. Retrieved July 30, 2021, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>
- Yan, X., Xiong, X., & Chen, Y. G. (2018). Feedback regulation of TGF- β signaling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(1), 37–50. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx129>
- Yang, C., Yuk, J., & Jo, E. (2009). The Role of Nitric Oxide in Mycobacterial Infections. *Immune Network*, 9(2), 46. <https://doi.org/10.4110/in.2009.9.2.46>
- Zelová, H., & Hošek, J. (2013). TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*, 62(7), 641–51. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>
- Zhou, Y., Do, D. C., Ishmael, F. T., Squadrito, M. L., Tang, H. M., Tang, H. L., ... Gao, P. (2018). Mannose receptor modulates macrophage polarization and allergic inflammation through miR-511-3p. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1), 350-364.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.049>

8 ANEXOS

8.1 Hoja de seguridad del Pb

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

SAFETY DATA SHEET

Version 4.7
Revision Date 02/28/2015
Print Date 08/20/2015

1. PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION

1.1 Product identifiers

Product name : Lead(II) acetate trihydrate

Product Number : 215902
Brand : Sigma-Aldrich
Index-No. : 082-005-00-8

CAS-No. : 6080-56-4

1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Identified uses : Laboratory chemicals, Manufacture of substances

1.3 Details of the supplier of the safety data sheet

Company : Sigma-Aldrich
3050 Spruce Street
SAINT LOUIS MO 63103
USA

Telephone : +1 800-325-5832
Fax : +1 800-325-5052

1.4 Emergency telephone number

Emergency Phone # : (314) 776-8555

2. HAZARDS IDENTIFICATION

2.1 Classification of the substance or mixture

GHS Classification in accordance with 29 CFR 1910 (OSHA HCS)

Reproductive toxicity (Category 1A), H360

Acute aquatic toxicity (Category 1), H400

Chronic aquatic toxicity (Category 1), H410

For the full text of the H-Statements mentioned in this Section, see Section 16.

2.2 GHS Label elements, including precautionary statements

Pictogram



Signal word : Danger

Hazard statement(s)

H360 : May damage fertility or the unborn child.

H410 : Very toxic to aquatic life with long lasting effects.

Precautionary statement(s)

P201 : Obtain special instructions before use.

P202 : Do not handle until all safety precautions have been read and understood.

P273 : Avoid release to the environment.

P281 : Use personal protective equipment as required.

P308 + P313 : IF exposed or concerned: Get medical advice/ attention.

P391 : Collect spillage.

P405 : Store locked up.

P501

Dispose of contents/ container to an approved waste disposal plant.

2.3 Hazards not otherwise classified (HNOC) or not covered by GHS - none

3. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

3.1 Substances

Formula : $C_4H_6O_4Pb \cdot 3H_2O$
Molecular weight : 379.33 g/mol
CAS-No. : 6080-56-4
EC-No. : 206-104-4
Index-No. : 082-005-00-8

Hazardous components

Component	Classification	Concentration
Lead di(acetate) trihydrate	Included in the Candidate List of Substances of Very High Concern (SVHC) according to Regulation (EC) No. 1907/2006 (REACH)	
	Repr. 1A; Aquatic Acute 1; Aquatic Chronic 1; H360, H410	<= 100 %

For the full text of the H-Statements mentioned in this Section, see Section 16.

4. FIRST AID MEASURES

4.1 Description of first aid measures

General advice

Consult a physician. Show this safety data sheet to the doctor in attendance. Move out of dangerous area.

If inhaled

If breathed in, move person into fresh air. If not breathing, give artificial respiration. Consult a physician.

In case of skin contact

Wash off with soap and plenty of water. Consult a physician.

In case of eye contact

Flush eyes with water as a precaution.

If swallowed

Never give anything by mouth to an unconscious person. Rinse mouth with water. Consult a physician.

4.2 Most important symptoms and effects, both acute and delayed

The most important known symptoms and effects are described in the labelling (see section 2.2) and/or in section 11

4.3 Indication of any immediate medical attention and special treatment needed

No data available

5. FIREFIGHTING MEASURES

5.1 Extinguishing media

Suitable extinguishing media

Use water spray, alcohol-resistant foam, dry chemical or carbon dioxide.

5.2 Special hazards arising from the substance or mixture

Carbon oxides, Lead oxides

5.3 Advice for firefighters

Wear self-contained breathing apparatus for firefighting if necessary.

5.4 Further information

No data available

6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

6.1 Personal precautions, protective equipment and emergency procedures

Use personal protective equipment. Avoid dust formation. Avoid breathing vapours, mist or gas. Ensure adequate ventilation. Evacuate personnel to safe areas. Avoid breathing dust.
For personal protection see section 8.

6.2 Environmental precautions

Prevent further leakage or spillage if safe to do so. Do not let product enter drains. Discharge into the environment must be avoided.

6.3 Methods and materials for containment and cleaning up

Pick up and arrange disposal without creating dust. Sweep up and shovel. Keep in suitable, closed containers for disposal.

6.4 Reference to other sections

For disposal see section 13.

7. HANDLING AND STORAGE

7.1 Precautions for safe handling

Avoid formation of dust and aerosols. Further processing of solid materials may result in the formation of combustible dusts. The potential for combustible dust formation should be taken into consideration before additional processing occurs.

Provide appropriate exhaust ventilation at places where dust is formed.

For precautions see section 2.2.

7.2 Conditions for safe storage, including any incompatibilities

Keep container tightly closed in a dry and well-ventilated place.

Light sensitive. Air sensitive.

Storage class (TRGS 510): Non-combustible, acute toxic Cat.3 / toxic hazardous materials or hazardous materials causing chronic effects

7.3 Specific end use(s)

Apart from the uses mentioned in section 1.2 no other specific uses are stipulated

8. EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION

8.1 Control parameters

Components with workplace control parameters

Component	CAS-No.	Value	Control parameters	Basis
Lead di(acetate) trihydrate	8080-56-4	TWA	0.050000 mg/m ³	USA. ACGIH Threshold Limit Values (TLV)
	Remarks	Central Nervous System impairment Hematologic effects Peripheral Nervous System impairment Substances for which there is a Biological Exposure Index or Indices (see BEI® section) Confirmed animal carcinogen with unknown relevance to humans varies		
		TWA	0.050000 mg/m ³	USA. NIOSH Recommended Exposure Limits
		See Appendix C		

8.2 Exposure controls

Appropriate engineering controls

Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice. Wash hands before breaks and at the end of workday.

Personal protective equipment

Eye/face protection

Safety glasses with side-shields conforming to EN166 Use equipment for eye protection tested and approved under appropriate government standards such as NIOSH (US) or EN 166(EU).

Skin protection

Handle with gloves. Gloves must be inspected prior to use. Use proper glove removal technique (without touching glove's outer surface) to avoid skin contact with this product. Dispose of contaminated gloves after use in accordance with applicable laws and good laboratory practices. Wash and dry hands.

Full contact

Material: Nitrile rubber

Minimum layer thickness: 0.11 mm

Break through time: 480 min

Material tested: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z877272, Size M)

Splash contact

Material: Nitrile rubber

Minimum layer thickness: 0.11 mm

Break through time: 480 min

Material tested: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z877272, Size M)

data source: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, phone +49 (0)6659 87300, e-mail sales@kcl.de, test method: EN374

If used in solution, or mixed with other substances, and under conditions which differ from EN 374, contact the supplier of the CE approved gloves. This recommendation is advisory only and must be evaluated by an industrial hygienist and safety officer familiar with the specific situation of anticipated use by our customers. It should not be construed as offering an approval for any specific use scenario.

Body Protection

impervious clothing. The type of protective equipment must be selected according to the concentration and amount of the dangerous substance at the specific workplace.

Respiratory protection

Where risk assessment shows air-purifying respirators are appropriate use a full-face particle respirator type N100 (US) or type P3 (EN 143) respirator cartridges as a backup to engineering controls. If the respirator is the sole means of protection, use a full-face supplied air respirator. Use respirators and components tested and approved under appropriate government standards such as NIOSH (US) or CEN (EU).

Control of environmental exposure

Prevent further leakage or spillage if safe to do so. Do not let product enter drains. Discharge into the environment must be avoided.

9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

9.1 Information on basic physical and chemical properties

a) Appearance	Form: solid Colour: white
b) Odour	No data available
c) Odour Threshold	No data available
d) pH	No data available
e) Melting point/freezing point	Melting point/range: 75 °C (167 °F) - dec.
f) Initial boiling point and boiling range	No data available
g) Flash point	No data available
h) Evaporation rate	No data available
i) Flammability (solid, gas)	No data available
j) Upper/lower	No data available

flammability or
explosive limits

k) Vapour pressure	No data available
l) Vapour density	No data available
m) Relative density	2.550 g/cm ³
n) Water solubility	No data available
o) Partition coefficient: n-octanol/water	No data available
p) Auto-ignition temperature	No data available
q) Decomposition temperature	No data available
r) Viscosity	No data available
s) Explosive properties	No data available
t) Oxidizing properties	No data available

9.2 Other safety information

No data available

10. STABILITY AND REACTIVITY

10.1 Reactivity

No data available

10.2 Chemical stability

Stable under recommended storage conditions.

10.3 Possibility of hazardous reactions

No data available

10.4 Conditions to avoid

No data available

10.5 Incompatible materials

Strong acids, Strong oxidizing agents

10.6 Hazardous decomposition products

Other decomposition products - No data available
In the event of fire: see section 5

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

11.1 Information on toxicological effects

Acute toxicity

LD50 Oral - Rat - 4,665 mg/kg

Inhalation: No data available

Dermal: No data available

No data available

Skin corrosion/irritation

No data available

Serious eye damage/eye irritation

No data available

Respiratory or skin sensitisation

No data available

Germ cell mutagenicity

May alter genetic material.

Carcinogenicity

This is or contains a component that has been reported to be carcinogenic based on its IARC, OSHA, ACGIH, NTP, or EPA classification.

IARC: 2A - Group 2A: Probably carcinogenic to humans (Lead di(acetate) trihydrate)

NTP: Reasonably anticipated to be a human carcinogen. The reference note has been added by TD based on the background information of the NTP. (Lead di(acetate) trihydrate)

OSHA: No component of this product present at levels greater than or equal to 0.1% is identified as a carcinogen or potential carcinogen by OSHA.

Reproductive toxicity

Known human reproductive toxicant

May cause reproductive disorders.

Specific target organ toxicity - single exposure

No data available

Specific target organ toxicity - repeated exposure

No data available

Aspiration hazard

No data available

Additional Information

RTECS: OF8050000

Lead salts have been reported to cross the placenta and to induce embryo- and fetal- mortality. They also have teratogenic effect in some animal species. No teratogenic effects have been reported with exposure to organometallic lead compounds. Adverse effects of lead on human reproduction, embryonic and fetal development, and postnatal (e.g., mental) development have been reported. Excessive exposure can affect blood, nervous, and digestive systems. The synthesis of hemoglobin is inhibited and results in anemia. If left untreated, neuromuscular dysfunction, possible paralysis, and encephalopathy can result. Additional symptoms of overexposure include: joint and muscle pain, weakness of the extensor muscles (frequently the hand and wrist), headache, dizziness, abdominal pain, diarrhea, constipation, nausea, vomiting, blue line on the gums, insomnia, and metallic taste. High body levels produce increased cerebrospinal pressure, brain damage, and stupor leading to coma and often death. May cause convulsions.

Stomach - Irregularities - Based on Human Evidence

Stomach - Irregularities - Based on Human Evidence

12. ECOLOGICAL INFORMATION**12.1 Toxicity**

No data available

12.2 Persistence and degradability

No data available

12.3 Bioaccumulative potential

No data available

12.4 Mobility in soil

No data available

12.5 Results of PBT and vPvB assessment

PBT/vPvB assessment not available as chemical safety assessment not required/not conducted

12.6 Other adverse effects

An environmental hazard cannot be excluded in the event of unprofessional handling or disposal.

Very toxic to aquatic life.

13. DISPOSAL CONSIDERATIONS**13.1 Waste treatment methods****Product**

Offer surplus and non-recyclable solutions to a licensed disposal company. Contact a licensed professional waste disposal service to dispose of this material. Dissolve or mix the material with a combustible solvent and burn in a chemical incinerator equipped with an afterburner and scrubber.

Contaminated packaging

Dispose of as unused product.

14. TRANSPORT INFORMATION**DOT (US)**

UN number: 1816 Class: 6.1 Packing group: III
Proper shipping name: Lead acetate
Reportable Quantity (RQ): 10 lbs

Poison Inhalation Hazard: No

IMDG

UN number: 1816 Class: 6.1 Packing group: III EMS-No: F-A, S-A
Proper shipping name: LEAD ACETATE
Marine pollutant: yes Marine pollutant: yes

IATA

UN number: 1816 Class: 6.1 Packing group: III
Proper shipping name: Lead acetate

15. REGULATORY INFORMATION**SARA 302 Components**

No chemicals in this material are subject to the reporting requirements of SARA Title III, Section 302.

SARA 313 Components

This material does not contain any chemical components with known CAS numbers that exceed the threshold (De Minimis) reporting levels established by SARA Title III, Section 313.

SARA 311/312 Hazards

Chronic Health Hazard

Massachusetts Right To Know Components

	CAS-No.	Revision Date
Lead di(acetate) trihydrate	6080-56-4	1993-04-24

Pennsylvania Right To Know Components

	CAS-No.	Revision Date
Lead di(acetate) trihydrate	6080-56-4	1993-04-24

New Jersey Right To Know Components

	CAS-No.	Revision Date
Lead di(acetate) trihydrate	6080-56-4	1993-04-24

California Prop. 65 Components

	CAS-No.	Revision Date
WARNING! This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer. Lead di(acetate) trihydrate	6080-56-4	2007-09-28

16. OTHER INFORMATION

Full text of H-Statements referred to under sections 2 and 3.

Aquatic Acute	Acute aquatic toxicity
Aquatic Chronic	Chronic aquatic toxicity
H360	May damage fertility or the unborn child.
H400	Very toxic to aquatic life.
H410	Very toxic to aquatic life with long lasting effects.
Repr.	Reproductive toxicity

HMIS Rating

Health hazard:	1
Chronic Health Hazard:	*
Flammability:	0
Physical Hazard	0

NFPA Rating

Health hazard:	0
Fire Hazard:	0
Reactivity Hazard:	0

Further information

Copyright 2015 Sigma-Aldrich Co. LLC. License granted to make unlimited paper copies for internal use only. The above information is believed to be correct but does not purport to be all inclusive and shall be used only as a guide. The information in this document is based on the present state of our knowledge and is applicable to the product with regard to appropriate safety precautions. It does not represent any guarantee of the properties of the product. Sigma-Aldrich Corporation and its Affiliates shall not be held liable for any damage resulting from handling or from contact with the above product. See www.sigma-aldrich.com and/or the reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Preparation Information

Sigma-Aldrich Corporation
Product Safety – Americas Region
1-800-521-8956

Version: 4.7

Revision Date: 02/28/2015

Print Date: 08/20/2015

8.2 Artículo científico producto de esta tesis

Ortiz-Robles CD, Cortés-Montoya V, Reyes-Aguilar SS, Albores A, Calderón-Aranda ES. Low concentrations of lead disturb phenotypical markers of the inflammatory and the anti-inflammatory profile of bone marrow-derived macrophages from BALB/c mice. *Toxicology*. 2021 Aug 2;460:152885.