



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“Efecto de la exposición a plomo sobre el estatus
antioxidante de plaquetas y su relación con la eriptosis en
trabajadores intoxicados”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Sandra Hernández García

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOQUÍMICA**

Director de Tesis: Dr. José Víctor Calderón Salinas

Ciudad de México

Agosto, 2023

El presente trabajo se realizó en el laboratorio No.25 del Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. José Víctor Calderón Sallinas. Fue financiado parcialmente por el apoyo FOINS-214108.

Durante el desarrollo de este proyecto el autor fue beneficiario de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de CVU/BECARIO 417246/ 588786 y número de beca 494586.

Los procedimientos propuestos en el presente proyecto están de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y con la declaración de Helsinki. La información obtenida de los pacientes se presentará de manera anónima y se cuenta con consentimiento informado de los pacientes en cuestión.

Proyecto de investigación aprobado por el Comité de Investigación del Hospital General de Alta Especialidad del Bajío y el Comité de Ética del Hospital con número de registro CI/HRAEB/2018/057.

El presente proyecto se realizó en colaboración con:

Departamento de Investigación del Hospital General de Alta Especialidad del Bajío, León Guanajuato. Dra. María Maldonado Vega, Investigador Titular.

Laboratorio de Trombosis y Fibrinólisis, Depto. de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez . Dra. Mirthala Flores García

Banco de Sangre del Hospital General Ticomán, CDMX. Dr. Facundo C. Meneses Melo

Departamento de Desarrollo Científico y Tecnológico para la Sociedad. CINVESTAV, IPN. Dr. José Gerardo Martín Hernández García

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Víctor Calderón Salinas, por aceptarme a su grupo de trabajo, por su asesoría, tiempo y aportes para el desarrollo de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca recibida en el periodo de octubre de 2017 a agosto de 2021.

A las colaboradoras externas del proyecto, la Dra. Maria Maldonado Vega y la Dra. Mirthala Flores García; por el apoyo, seguimiento, asesoría y recursos recibidos.

Al Dr. José Gerardo Martín Hernández García por el seguimiento y asesoría para el análisis estadístico de este trabajo, y por la sustancial participación en la preparación del artículo publicado con datos de esta tesis.

Al Dr. Guillermo Ávila Flores y la Dra. Angelica Rueda y Sánchez de la Vega por la asesoría, seguimiento, aportes y revisiones a este trabajo.

La M. en C. Nadia Cristina López Vanegas, por el apoyo brindado, las sugerencias, enseñanzas y la asistencia en la toma de muestra de las personas participantes en el proyecto.

Al Departamento de Bioquímica, por el acceso a las instalaciones, los equipos y el material de apoyo proporcionado.

Al M. en C. Víctor Hugo Rosales G. por el apoyo para el uso del citómetro de flujo.

A la Q.F.B. Margarita Marcela Rosas Flores y a Héctor Camacho, auxiliar y técnico de investigación, respectivamente, por su apoyo y asistencia técnica en el trabajo de laboratorio.

A la Lic. Angélica González Ceja, por la asistencia y seguimiento en los trámites académicos.

Las unidades administrativas y académicas del CINVESTAV-IPN: Control Escolar, Departamento de Becas, Biblioteca.

Al laboratorio 10 del Departamento de Bioquímica, por el uso de equipos durante el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Intoxicación por plomo	1
1.2 Manifestaciones clínicas de la intoxicación con plomo	3
1.3 Efecto del plomo a nivel molecular	3
1.4 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo	4
1.5 El plomo y el eritrocito	7
1.6 Eriptosis	8
1.7 Participación de la PGE ₂ en apoptosis y eriptosis	10
1.8 Síntesis de PGE ₂ por células sanguíneas	10
1.9 Plaquetas	12
1.9.1 Generación de plaquetas	13
1.9.2 Estructura plaquetaria	14
1.9.3 Función plaquetaria	14
1.10 Agregación plaquetaria, activación y especies reactivas de oxígeno	15
1.11 Secreciones plaquetarias como moduladores de la actividad de otros tipos celulares	17
2. ANTECEDENTES	19
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVO GENERAL	24
5.1 Objetivos específicos	24
6. METODOLOGÍA	25
6.1 Estrategia experimental	25
6.2 Obtención de muestras	26
	IV

6.3	Determinación de la concentración de plomo en sangre total	26
6.4	Determinación de la actividad de d-ALAD	27
6.5	Obtención de plaquetas	27
6.6	Activación de plaquetas	28
6.7	Incubación de plaquetas con plomo	28
6.8	Determinación de la actividad de la enzima catalasa en plaquetas	28
6.9	Determinación de liberación de anión superóxido por plaquetas	29
6.10	Determinación de la lipoperoxidación en plaquetas	29
6.11	Peróxido de hidrógeno producido en plaquetas	30
6.12	Concentración de NADPH en plaquetas	30
6.13	Determinación de concentración de PGE ₂ en plasma de trabajadores crónicamente expuestos a plomo	31
6.14	Incubación de eritrocitos con sobrenadantes de plaquetas.	31
6.15	Análisis de externalización de fosfatidilserina en eritrocitos	32
6.16	Incubaciones conjuntas de eritrocitos, plomo y plaquetas.	32
6.17	Incubación de eritrocitos con plasma de trabajadores intoxicados.	33
6.18	Ensayos de agregación plaquetaria en plasma rico en plaquetas.	33
6.19	Ensayos de agregación plaquetaria en sangre total.	33
7.	RESULTADOS	35
7.1	Grupos de estudio	35
7.1.1	Marcadores de intoxicación por plomo	35
7.1.2	Conteo plaquetario	38
7.2	Agregación plaquetaria	39
7.2.1	Experimentos <i>in vitro</i>	39
7.2.2	Agregación plaquetaria en muestras de trabajadores expuestos a plomo	41
7.3	Estatus antioxidante plaquetario	42
7.3.1	Ensayos <i>in vitro</i>	43
7.3.1.1	Actividad de catalasa	43
7.3.1.2	Lipoperoxidación	44
7.3.1.3	Liberación de superóxido	45
7.3.2	Estatus antioxidante de plaquetas de trabajadores expuestos a plomo	47

7.3.2.1	Actividad de la enzima catalasa	47
7.3.2.1.1	Actividad de catalasa en plaquetas en reposo	47
7.3.2.1.2	Actividad de catalasa en plaquetas activadas	48
7.3.2.2	Lipoperoxidación	49
7.3.2.2.1	Lipoperoxidación en plaquetas en reposo	49
7.3.2.2.2	Lipoperoxidación en plaquetas activadas	49
7.3.2.3	Liberación de anión superóxido	50
7.3.2.3.1	Liberación de anión superóxido por plaquetas en reposo	50
7.3.2.3.2	Liberación de anión superóxido por plaquetas activadas	50
7.3.2.4	Concentración de peróxido de hidrógeno	51
7.3.2.4.1	Concentración de peróxido de hidrógeno en plaquetas en reposo	51
7.3.2.4.2	Concentración de peróxido de hidrógeno en plaquetas activadas	51
7.3.2.5	Concentración de NADPH	53
7.3.2.5.1	Concentración de NADPH en plaquetas en reposo	53
7.3.2.5.2	Concentración de NADPH en plaquetas activadas	53
7.4	Eriptosis en muestras incubadas con plasma de trabajadores intoxicados	54
7.5	Concentración de PGE ₂ en plasma de trabajadores intoxicados	55
7.6	Eriptosis en eritrocitos de donadores clínicamente sanos incubados con plaquetas en presencia de plomo.	56
7.7	Eriptosis en eritrocitos icubados con sobrenadantes de plaquetas	57
7.8	Eriptosis en eritrocitos incubados con sobrenadantes de plaquetas expuestas a plomo	59
8.	DISCUSIÓN	62
9.	CONCLUSIONES	71
10.	PERSPECTIVAS	73
11.	BIBLIOGRAFÍA	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos moleculares del proceso apoptótico en eritrocitos.	8
Figura 2. Cascada del ácido araquidónico.	11
Figura 3. Mecanismos propuestos para la producción de plaquetas.	13
Figura 4. Producción de especies reactivas de oxígeno y su interacción con eventos de activación en plaquetas.	16
Figura 5. PGE ₂ plaquetaria como modulador de la actividad celular.	18
Figura 6. Boxplot de la concentración de plomo en sangre y actividad de δ -ALAD en trabajadores expuestos.	37
Figura 7. Gráfico de conteos plaquetarios en trabajadores expuestos a plomo.	38
Figura 8. Boxplot de la agregación plaquetaria en trabajadores expuestos a plomo evaluada por agregometría.	42
Figura 9. Boxplot de la actividad de catalasa en plaquetas incubadas con plomo.	44
Figura 10. Boxplot de la lipoperoxidación en plaquetas incubadas con plomo.	45
Figura 11. Boxplot de la liberación de superóxido por plaquetas incubadas con plomo.	46
Figura 12. Boxplot de la actividad de catalasa en plaquetas activadas y en reposo de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo.	48
Figura 13. Boxplot de la lipoperoxidación en plaquetas activadas y en reposo de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo.	49
Figura 14. Boxplot de la liberación de superóxido por plaquetas activadas y en reposo de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo.	51

Figura 15. Boxplot de la concentración de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en plaquetas activadas y en reposo de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo.	52
Figura 16. Boxplot de la concentración de NADPH en plaquetas activadas y en reposo de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo.	53
Figura 17. Boxplot de la externalización de fosfatidilserina (FS) en eritrocitos de donadores no expuestos incubados con plasma de trabajadores expuestos a plomo.	55
Figura 18. Boxplot de la concentración de prostaglandina E ₂ (PGE ₂) en plasma de trabajadores intoxicados.	56
Figura 19. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos incubados con plomo en presencia de plaquetas.	57
Figura 20. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos incubados con sobrenadantes de plaquetas.	58
Figura 21. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos incubados con sobrenadantes de plaquetas preincubadas con AAS.	59
Figura 22. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos incubados con sobrenadantes de plaquetas preincubadas con plomo y/o ácido acetilsalicílico.	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Radicales libres y mecanismos de defensa antioxidante.	6
Tabla 2. Producción de PGE ₂ por células sanguíneas humanas.	12
Tabla 3. Concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y fragilidad osmótica (OS50) en eritrocitos de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo.	19
Tabla 4. Concentración de plomo en sangre, actividad de δ-ALAD, lipoperoxidación, concentración de calcio intracelular ([Ca ²⁺] _i) libre y concentración de PGE ₂ en eritrocitos de pacientes no expuestos y expuestos a plomo.	20
Tabla 5. Resultados obtenidos de la curva concentración-respuesta y curso temporal de la agregación plaquetaria (%) por método óptico, con ADP 10μM como agente agonista.	40
Tabla 6. Resultados obtenidos de la curva concentración-respuesta y curso temporal de la agregación plaquetaria (ohms) por método de impedancia, con ADP 10μM como agente agonista.	41

ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ADP	Adenosín difosfato
ALA	Ácido aminolevulínico
AKT	Proteína cinasa B
CAT	Catalasa
Ca ²⁺	Calcio
COX	Ciclooxygenasa
Cu ²⁺	Cobre
C3	Componente 3 del complemento
C4	Componente 4 del complemento
DAR	Deshidroascorbato reductasa
DMS	Sistema de demarcación membranal plaquetario
δ-ALAD	Ácido aminolevulínico deshidratasa
EMT	Transición epitelio-mesenquimal
Fe ²⁺	Hierro
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación transferasa
G6-PD	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IQ	Coeficiente intelectual
MDA	Malondialdehído
Mg ²⁺	Magnesio
MTT	1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan, Thiazolyl blue formazan

Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NADP	Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina
NADPH	Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina reducido
Na ₄ EDTA	EDTA tetrasódico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NETs	Trampas extracelulares de neutrófilos
PAF	Factor activador plaquetario
Pb(NO ₃) ₂	Nitrato de plomo
PF4	Factor plaquetario 4
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PPP	Plasma pobre en plaquetas
PRP	Plasma rico en plaquetas
RANTES	Quimiocina CCL5
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superoxido dismutasa
TBARs	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Zn ²⁺	Zinc

RESUMEN

México es uno de los 5 principales productores mundiales de plomo, lo que favorece la incidencia de casos de intoxicación en trabajadores de la industria y habitantes de poblaciones cercanas. Altas concentraciones de plomo se relacionan con la generación de radicales libres y daño oxidativo, así como alteraciones en la función de proteínas e incremento de la eriptosis, cuyos mecanismos no han sido descritos en su totalidad en el contexto de la intoxicación por este metal, y se ha propuesto la participación de mediadores exógenos como la PGE₂ producida por las plaquetas.

En este trabajo encontramos en trabajadores expuestos a plomo (n=29) de una recicladora de baterías, una mayor concentración de plomo (28 veces) y una menor actividad de δ -ALAD (4 veces) con respecto a trabajadores no expuestos (n=21), y menor agregación plaquetaria (35%) en respuesta a ADP.

En plaquetas en reposo de trabajadores expuestos (n=21) se observó una menor actividad de la enzima catalasa y una menor lipoperoxidación. En plaquetas activadas con ADP se encontró una menor liberación de anión superóxido, menor contenido de NADPH y un mayor contenido de peróxido de hidrógeno en comparación con plaquetas de individuos no expuestos (n=21).

En plaquetas incubadas con 0.4 y 4 μ M de Pb(NO₃)₂ se determinó la actividad de catalasa (n=13) y la lipoperoxidación (0.4, 4 y 40 μ M de Pb(NO₃)₂, n=10) sin encontrar cambios significativos. Por otra parte, plaquetas incubadas con 0.4, 4 y 40 μ M de Pb(NO₃)₂, liberaron cantidades significativamente mayores de anión superóxido en comparación con las plaquetas control (n=10).

Se analizó el efecto del plasma de trabajadores intoxicados sobre eritrocitos de donadores no expuestos, y se encontró que incrementa la apoptosis de los mismos (32%). Estos trabajadores además tienen mayores concentraciones de PGE₂ (2.6 veces) que trabajadores no expuestos. En incubaciones de eritrocitos con Pb(NO₃)₂ se encontró un incremento estadísticamente significativo en la eriptosis al usar 40 μ M de Pb(NO₃)₂ con la necesaria presencia de plaquetas. El mismo resultado fue observado cuando se incubaron eritrocitos únicamente con sobrenadantes de plaquetas que previamente habían sido expuestas a plomo y activadas con ADP (n=13). Mediante el uso de ácido acetilsalicílico (n=13) para inhibir a la enzima ciclooxigenasa se determinó la participación de la PGE₂ plaquetaria en la inducción de eriptosis en el contexto de la intoxicación por plomo.

En conclusión, en este trabajo se encontraron, en trabajadores expuestos a plomo, bajos porcentajes de agregación plaquetaria que estarían influenciados por las alteraciones en la respuesta del sistema oxidante/antioxidante plaquetario y las altas concentraciones plasmáticas de PGE₂, que además participa como un mecanismo de inducción de la eriptosis.

ABSTRACT

Mexico is one of the world's top 5 lead producers, which contributes to the incidence of lead poisoning cases among industry workers and the habitants of nearby towns. High lead concentrations are related to the generation of free radicals and oxidative damage, as well as alterations in protein function and increased eryptosis, whose mechanisms have not yet been fully described in the context of lead poisoning, and the participation of exogenous mediators such as PGE₂ produced by platelets has been proposed.

In lead-exposed workers (n=29) of a battery recycler, we found a higher lead concentration (28 times) and a lower δ-ALAD activity (4 times) compared to non-exposed workers (n=21), and lower platelet aggregation (35%) in response to ADP. In resting platelets of exposed workers (n=21), lower catalase enzyme activity and lower lipoperoxidation were observed. In platelets activated with ADP, lower superoxide anion release, lower NADPH content, and higher hydrogen peroxide content were found compared to platelets from non-exposed workers (n=21).

In platelets incubated with Pb(NO₃)₂, catalase activity (0.4 and 4 μM of Pb(NO₃)₂, n=13) and lipoperoxidation (0.4, 4 and 40 μM of Pb(NO₃)₂, n=10) were determined without finding significant changes. On the other hand, platelets incubated with 0.4, 4, and 40 μM of Pb(NO₃)₂, released significantly higher amounts of superoxide anion compared to control platelets (n=10).

The effect of plasma from intoxicated workers on erythrocytes from non-exposed donors was analyzed, and an increase (32%) in apoptosis was found in erythrocytes incubated with plasma from exposed workers, which have higher PGE₂ concentrations (2.6 times) than non-exposed workers. In incubations of erythrocytes with Pb(NO₃)₂, a statistically significant increase in erythrocytosis was found when using 40 μM of Pb(NO₃)₂ with the necessary presence of platelets. The same result was observed in erythrocytes that were incubated only with supernatants of platelets that had previously been exposed to lead and activated with ADP (n=13). Using acetylsalicylic acid (n=13) to inhibit the enzyme cyclooxygenase, the involvement of platelet PGE₂ in the induction of erythrocytosis in the context of lead poisoning was determined.

In conclusion, in this work, we found low percentages of platelet aggregation in lead-exposed workers that would be influenced by alterations in the response of the platelet oxidant/antioxidant system and high plasma concentrations of PGE₂, which also participates as a mechanism for the eryptosis induction.

1. INTRODUCCIÓN

El plomo es un metal pesado con número atómico 82 y peso molecular 207.21, miembro del grupo 14 de la tabla periódica. Su estado de oxidación más habitual es +2. Debido a sus características fisicoquímicas (suavidad, maleabilidad, ductilidad, poca conductibilidad, resistencia a la corrosión, bajo punto de fusión) ha sido ampliamente utilizado en la industria desde hace muchos años [1, 2]. Se tiene documentado el uso del metal por las culturas china, fenicia, hindú, egipcia y griega, y existen antecedentes de asociación de plomo con afectaciones a la salud desde 200 a.C. Actualmente se utiliza para aleaciones que forman parte de baterías, acumuladores, pigmentos, electrodos, aditivos, plaguicidas, insecticidas, cosméticos, soldadura, pinturas, cerámica, etc. [3].

Aunque es muy popular en la industria, la cantidad que se recicla de manera adecuada es baja. Además, debido a que no es biodegradable, las partículas de plomo desechadas por la industria o liberadas de materiales que lo contienen pueden estar suspendidas en el aire, depositarse en el suelo o ser arrastradas por agua de lluvia hacia ríos y lagos, así, se acumula en el ambiente, principalmente en zonas aledañas a las industrias que lo procesan, y constituye una vía de exposición para la población.

1.1 Intoxicación por plomo

El plomo es bioacumulable, por lo que es posible que una persona alcance un estado de intoxicación cuando se expone al metal crónicamente [3]. La exposición del ser humano al plomo puede ocurrir de varias formas:

- a) Laboral- se presenta cuando un trabajador se expone a niveles superiores a los recomendados para la industria, con procesos o sistemas de seguridad deficientes.

- b) Paralaboral- se da cuando un trabajador se contamina en el trabajo y lleva el plomo a su domicilio en su ropa o herramientas de trabajo.
- c) Laboral-domiciliaria- en esta variedad el domicilio se contamina por realizar dentro del mismo actividades laborales relacionadas con el metal.
- d) Ambiental- es la contaminación que se encuentra en ambientes abiertos, por cercanía con fuentes contaminantes que afectan tierra, aire y agua.
- e) Domiciliaria- se presenta cuando los elementos contaminantes se encuentran dentro del hogar (utensilios, pintura, muebles, juguetes, accesorios y cosméticos).

Cuando se expone a plomo, el organismo puede tener contacto directo con el metal por tres vías: respiratoria, digestiva y dérmica, siendo la primera la más importante por el gran volumen de aire que tiene contacto en cada respiración, y si las características de las partículas lo permiten, el plomo es absorbido hasta en un 50%. El tubo digestivo es la segunda vía de entrada de plomo; con una absorción mayor en niños y mujeres embarazadas (40-50%) que en adultos (3-10%) [1]. Por esta vía, la absorción de plomo ocurre mediante los mismos mecanismos utilizados para la entrada de elementos como calcio (Ca^{2+}) y hierro (Fe^{2+}), y depende de los siguientes factores: a) solubilidad, pues algunas sales de plomo son más solubles en medios ácidos; b) tamaño de la partícula, ya que las partículas finas son más fácilmente absorbidas que las grandes; c) deficiencias nutricionales, por ejemplo, cuando existen deficiencias de zinc (Zn^{2+}), cobre (Cu^{2+}) y Ca^{2+} , los niveles de absorción de plomo pueden incrementarse. Por último, aunque la piel es el órgano con mayor área de contacto, representa la vía con menor absorción de plomo, importante únicamente a exposiciones prolongadas, o cuando se tiene contacto con sales liposolubles [4].

1.2 Manifestaciones clínicas de la intoxicación con plomo

No existe un nivel de plomo necesario o benéfico para el organismo, ni tampoco niveles seguros de exposición [5]. Cuando un organismo es intoxicado por plomo pueden presentarse afectaciones e interferencias en:

- a) Sistema hematopoyético: La anemia es la manifestación clínica clásica de la intoxicación con plomo, pues afecta la síntesis de hemoglobina y provoca oxidación. El modelo clásico de estudio de intoxicación por plomo es el eritrocito, en menor medida los leucocitos, y no se ha determinado el papel que pudiera tener a nivel celular sobre la población plaquetaria [4-6].
- b) Sistema nervioso: Tanto el sistema nervioso central como el periférico son afectados por el plomo. Se puede presentar: baja concentración, disminución de IQ, fatiga, encefalopatía, irritabilidad, dolor de cabeza, mareos y alucinaciones [4-6].
- c) Sistema renal: a altas concentraciones, se disminuye la reabsorción tubular y la tasa de filtración glomerular, pudiendo provocar disfunción renal [6, 7].
- d) Sistema gastrointestinal: la intoxicación con plomo provoca náuseas, vómito, dolor abdominal y estreñimiento [6].

Entre otros efectos se incluyen: dolor muscular y articular, pérdida de peso, afectaciones a desarrollo del feto, y alteraciones en sistema reproductor [4, 5].

1.3 Efecto del plomo a nivel molecular

El plomo afecta procesos biológicos fundamentales por su habilidad de sustituir desde concentraciones picomolares a cationes divalentes de importancia biológica como el Ca^{2+} , con el cual compite por la entrada a las células y por la unión a proteínas (calmodulina), por lo que puede alterar su homeostasis intracelular e incluso activar proteínas que de manera fisiológica se activan por Ca^{2+} (PKC); por otra parte, el plomo puede desplazar cationes que frecuentemente se encuentran en sitios activos de algunas proteínas (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) e inactivarlas [8]. Ejemplos de las enzimas que pueden ser inhibidas por plomo *in vitro* son la delta-

aminolevulínico deshidratasa (60% de inhibición con 10 µg/dL de plomo), la glutatión reductasa (25% de inhibición con 400 µg/dL de plomo), la glutatión peroxidasa (43% de inhibición con 400 µg/dL de plomo), la glutatión transferasa (50% de inhibición con 400 µg/dL de plomo), la superóxido dismutasa (10% de inhibición con 400 µg/dL de plomo) y la catalasa (20% de inhibición con 400 µg/dL de plomo) [5, 9-11]. Además dentro de las células el plomo propicia el ambiente adecuado para la generación de daño oxidativo y puede llevarlas a una fase de apoptosis por un efecto multifactorial, induciendo oxidación por dos mecanismos: el primero involucra la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (hidroperóxidos, peróxido de hidrógeno, etc.) y el segundo consiste en depletar el “pool” antioxidante de sulfhidrilos de la célula, principalmente el glutatión [1, 4, 5, 11].

1.4 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

Todos los tipos celulares del organismo se exponen constantemente a ambientes con agresores oxidativos, por ello la generación de radicales libres, especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de oxígeno (ROS) es un fenómeno que se da de manera regular dentro de las células, como parte de las reacciones para obtener energía y otras del metabolismo intermedio. Existen varias fuentes de ROS en la célula, entre las que destacan la mitocondria (complejo I y complejo III), los peroxisomas y los lisosomas. En condiciones normales, a bajas concentraciones, las RNS y ROS participan en la respuesta celular contra agentes infecciosos y en sistemas de señalización [12, 13].

De manera ideal cuando las células no enfrentan una agresión grave, los niveles intracelulares de moléculas oxidantes como las ROS se mantienen bajos gracias a un sistema de amortiguamiento reductor y a la actividad de enzimas antioxidantes. Sin embargo, frente a ciertos tipos de agresiones externas como la exposición química, la contaminación o la radiación, la producción de radicales libres y ROS puede exacerbarse, llevando a las células a un estado de estrés oxidativo, que se define como un desbalance entre la producción de especies prooxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante, esto es, cuando el proceso homeostático falla

y la generación de radicales libres y ROS es mucho mayor que la capacidad de respuesta del organismo. A nivel celular daña a biomoléculas y su impacto depende del tipo de oxidante, el sitio y la intensidad de producción y la habilidad de respuesta del organismo (expresión de proteínas, cambios cinéticos, etc.) [12, 14].

Existe toda una gama de agentes prooxidantes, así como de mecanismos de defensa antioxidantes implicados en el mantenimiento de la homeostasis redox en el organismo que se resumen más adelante (Tabla 1), entre ellos, en la categoría de metales destaca de manera importante el plomo, un metal capaz de generar estrés oxidativo [14].

El plomo genera daño oxidativo por radicales libres y ROS de manera directa e indirecta, utilizando varios mecanismos. El más común es desencadenar reacciones tipo Fenton y Haber-Weiss, que culminan en la generación de peróxidos lipídicos y radical superóxido e hidroxilo, que oxidan moléculas dentro de la célula generando un daño de magnitud considerable que se manifiesta principalmente como lipoperoxidación. Todo lo anterior ha sido bien determinado como el daño clásico del metal al eritrocito, célula a la que la intoxicación por plomo, como antes se mencionó, lleva incluso a la apoptosis; sin embargo, el papel del plomo sobre el estatus antioxidante de leucocitos y plaquetas no ha sido descrito a detalle.

Tabla 1. Radicales libres y mecanismos de defensa antioxidante

RADICALES LIBRES	
Especies reactivas de oxígeno	Oxígeno molecular, ozono, oxígeno en singulete, anión superóxido, peróxido de hidrógeno, hidroperoxilo, radical hidroxilo.
Metales	Fe, Mn, Co, Ni, Cu, Cd, Pb
Otros radicales libres	Óxido nítrico, dióxido nítrico, peroxinitrito, ion hipoclorito, radical triclorometilo
MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	
Macromoléculas que captan especies reactivas	Transferrina, ceruloplasmina, hemoglobina, mioglobina.
Enzimas antioxidantes	Superóxido dismutasa (SOD), Glutación peroxidasa(GPx), Glutación sulfhidril transferasa(GST), catalasa (CAT).
Cosustratos antioxidantes	Glutación reducido (GHS), NADPH
Enzimas que regeneran sustratos o cosustratos oxidantes	Glutación reductasa (GR), tocoferilquinona reductasa, deshidroascorbato reductasa (DAR),
Antioxidantes endógenos	Albúmina, ácido úrico, coenzima Q, bilirrubina, melatonina.
Antioxidantes exógenos	Vitamina E, Vitamina C, β -caroteno, polifenoles, licopenos, flavonoides, entre otros.
Sistemas de reparación	Tiorreductasa, metionina sulfóxido reductasa, fosfolipasa A ₂

1.5 El plomo y el eritrocito

Los eritrocitos constituyen la ruta de distribución de plomo a tejidos y órganos. Del plomo que ingresa al torrente sanguíneo, la mayor parte, aproximadamente el 90%, se almacena dentro del eritrocito.

La entrada de plomo al eritrocito se da debido a que el metal posee la misma permeabilidad y es transportado por el mismo sistema de transporte que el Ca^{2+} [15]. Una vez dentro, el plomo estimula directa o indirectamente los canales de Ca^{2+} para permitir el influjo del ion, e inhibe la actividad de la bomba encargada de la extrusión de éste, la ATPasa de Ca^{2+} , lo que provoca un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular libre, desencadenando cambios en el estado fisicoquímico de la membrana, que se manifiestan como un incremento en la fragilidad osmótica y cambios morfológicos drásticos en el eritrocito [3].

El efecto que la intoxicación por plomo tiene sobre los eritrocitos se debe en gran medida a su capacidad de interacción con elementos citoplasmáticos y membranales, con los que genera uniones covalentes y estereoespecíficas. Se ha observado que la intoxicación por plomo induce daño oxidativo mediante afectaciones a la capacidad antioxidante total, a la tasa GSH/GSSG y a la actividad de enzimas como la glutatión reductasa, G6PD, catalasa y superóxido dismutasa. La entrada pasiva de Ca^{2+} al eritrocito se favorece por el incremento en la lipoperoxidación, que resulta en la alteración de la estructura membranal y facilita la activación de canales permeables a cationes. La administración de antioxidantes ha demostrado mejorar estas condiciones [16]. Los eritrocitos son células muy sensibles a insultos oxidativos por las altas concentraciones de oxígeno (O_2) a las que se exponen, por ello, el efecto del plomo en forma de estrés oxidativo y osmótico puede llegar a niveles que superen la capacidad de resiliencia eritrocitaria, capaces de desencadenar procesos que culminan en la muerte celular del eritrocito (Figura 1) [17].

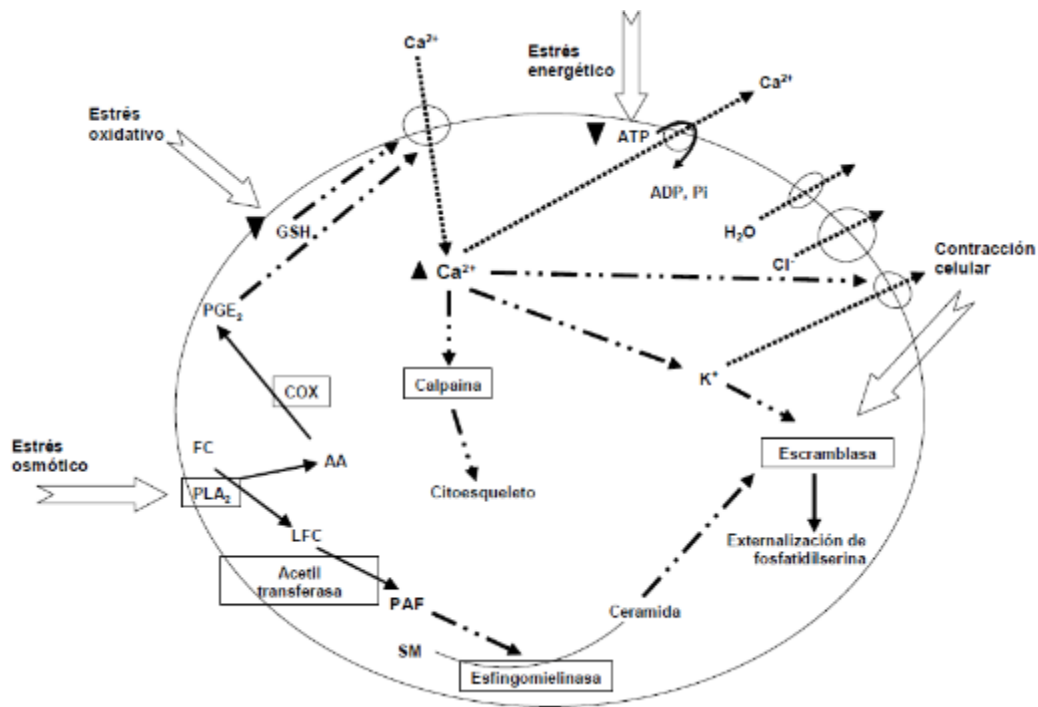


Figura 1. Mecanismos moleculares del proceso apoptótico en eritrocitos. Esquema de un eritrocito en eriptosis. Fosfolipasa A₂ (PLA₂), ácido araquidónico (AA), fosfatidilcolina (FC), lisofosfatidilcolina (LFC), factor de activación plaquetaria (PAF), esfingomielina (SM), glutatión reducido (GSH), prostaglandina E₂ (PGE₂), ciclooxigenasa (COX). Tomada de Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, (2006) [19].

1.6 Eriptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo fisiológico que elimina las células envejecidas o potencialmente perjudiciales, sin afectar el tejido circundante, y se caracteriza por eventos como: condensación nuclear, fragmentación de ácidos nucleicos, disminución del volumen celular, despolarización mitocondrial, colapso del citoesqueleto, pérdida de potasio (K⁺), activación de calpaína y caspasas (iniciadoras y efectoras), y pérdida de la asimetría de la membrana plasmática con externalización de fosfatidilserina, lo que facilita la fagocitosis celular [18]. La eriptosis es la apoptosis que ocurre en el eritrocito. El tiempo de vida media de los eritrocitos es de aproximadamente 120 días. En el eritrocito se presentan eventos moleculares característicos de la apoptosis tardía

(desequilibrio osmótico, activación de canales de Ca^{2+} y escramblasas, contracción celular, activación de caspasas y esfingomielinasa, así como externalización de fosfatidilserina). Eventos de la fase temprana (lisis mitocondrial, fragmentación de ADN, lisis nuclear, activación de caspasas) de la apoptosis se observan en eritroblastos, lo que parece indicar que los eritrocitos se encuentran en un estado de “apoptosis suspendida” [19].

La eriptosis puede ser desencadenada por tres tipos de estrés: osmótico, oxidativo y energético. Los mecanismos moleculares generales involucrados en la eriptosis incluyen:

- A) Incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular: el estrés osmótico activa a la fosfolipasa A_2 , lo que desencadena el proceso de activación de la esfingomielinasa y la producción de prostaglandina E_2 (PGE_2), un mediador capaz de activar canales catiónicos no selectivos que permiten la entrada de Ca^{2+} a la célula. El estrés oxidativo también puede activar canales catiónicos permeables a Ca^{2+} [18-21].
- B) Activación de μ -calpaína y contracción celular: el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular activa a la μ -calpaína, una proteasa responsable de degradar proteínas involucradas en la estabilidad del citoesqueleto. El Ca^{2+} también activa canales de K^+ ($\text{K}_{\text{Ca}3.1}$), provocando su salida y en consecuencia la hiperpolarización de la membrana celular, que al tender al potencial de equilibrio para el K^+ crea un gradiente electroquímico favorable para la liberación de cloro (Cl^-). Todo lo anterior, en conjunto, contribuye a la contracción celular y a la generación de estrés osmótico [18-21].
- C) Externalización de Fosfatidilserina: las ceramidas formadas en repuestas al estrés osmótico (que desencadena la formación de ceramidas), así como altas concentraciones de Ca^{2+} , activan indirectamente una escramblasa de fosfatidilserina, favoreciendo la externalización del fosfolípido, y con ello la culminación de la eriptosis con la fagocitosis del eritrocito [18-21].

1.7 Participación de la PGE₂ en apoptosis y eriptosis

El incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular es el factor medular del proceso de eriptosis. Dentro de los mediadores involucrados en la entrada de Ca²⁺ al eritrocito se encuentra la PGE₂.

La PGE₂ es un mediador lipídico que está involucrado en un amplio número de funciones biológicas entre las que destacan: proliferación, angiogénesis, procesos cancerígenos, inflamación, apoptosis y respuesta inmune [22-24].

El papel de PGE₂ en la apoptosis depende del tipo celular en estudio: en algunas células (células epiteliales, células T, adipocitos, células de cáncer de pulmón) tiene efectos anti apoptóticos y en otras (células corticales, fibroblastos, mastocitos) es considerado un factor proapoptótico [25-30].

En eritrocitos se ha comprobado que la PGE₂ participa en mecanismos involucrados en la eriptosis como el ingreso de Ca²⁺ extracelular mediante la activación de canales catiónicos no selectivos, la estimulación de la salida de K⁺ a través de canales Gardos, la activación de μ -calpaína, y la estimulación de la externalización de fosfatidilserina [20, 31, 32]. Hasta la fecha, no existe un reporte que analice de manera específica si la PGE₂ responsable de los efectos antes mencionados proviene de los mismos eritrocitos, o si constituye un mediador proveniente de la secreción de otro grupo celular sanguíneo.

1.8 Síntesis de PGE₂ por células sanguíneas

La PGE₂ es un miembro de la familia de los eicosanoides y es sintetizada por casi todos los tipos celulares en respuesta a una variedad de estímulos [33]. Es uno de los productos del metabolismo de un fosfolípido de membrana celular que es hidrolizado por la fosfolipasa A₂ para liberar el ácido araquidónico, un ácido graso poliinsaturado que es oxidado mediante la vía de la enzima ciclooxigenasa (COX), una enzima con dos isoformas (COX-1 y COX-2) que se expresan en diferentes tipos de células (Figura 2) [33-35].

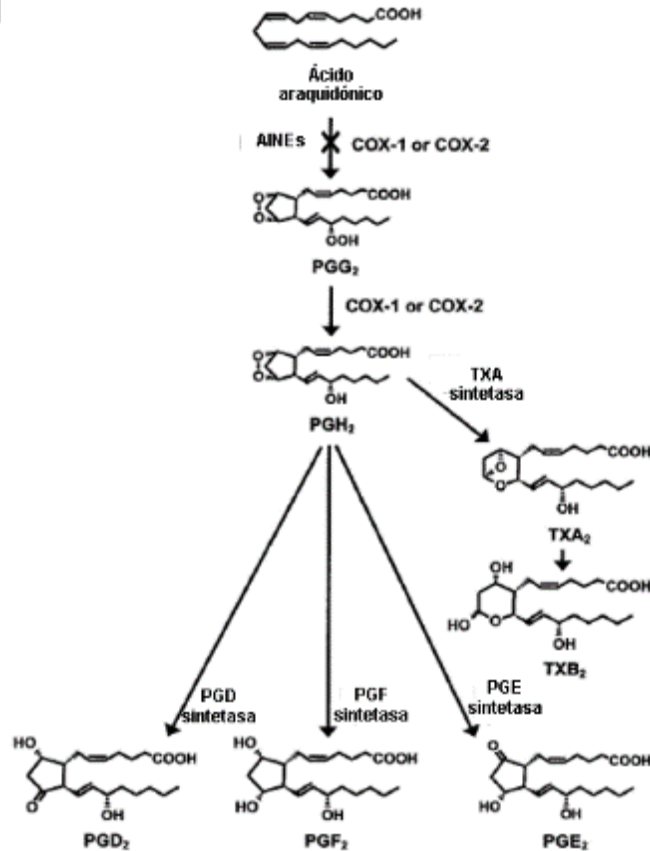


Figura 2. Cascada del ácido araquidónico. El ácido araquidónico en las células es metabolizado por ciclooxygenasas a prostaglandina H₂ vía prostaglandina G₂. Los antiinflamatorios no esteroideos bloquean la síntesis de prostaglandina G₂. La prostaglandina H₂ es isomerizada, oxidada o reducida para generar prostaglandina D₂, F₂ y E₂. Modificada de Simmons et al, (2004) [35].

Entre las prostaglandinas, la prostaglandina E (PGE) es la más producida en el cuerpo humano; no es bioacumulable, y es secretada al medio extracelular por difusión simple o por medio del transportador MRP4 inmediatamente después de ser sintetizada [36].

Entre las poblaciones celulares con importante producción de prostaglandinas se encuentran las células circulatorias. Como se indica en la tabla 2, las plaquetas son las células sanguíneas que producen mayores cantidades de PGE₂, por lo que se podrían ser la fuente de PGE₂ que media la eritrosis en trabajadores intoxicados por plomo, sin embargo, no se encuentran reportes que describan los niveles de PGE₂ producidos cuando las células sanguíneas se enfrentan a condiciones de intoxicación por metales, especialmente por plomo.

Tabla 2. Producción de PGE₂ por células sanguíneas humanas.

Célula	PGE₂ producida/ núm de células	Células/ml de sangre total	PGE₂ producida/ml de sangre total	Estímulo o condición	Referencia
Eritrocitos	23.76 pg/10 ⁹	4.6-5.5 x 10 ⁹	109 - 130 pg	EM	Oonishi, 1998.
	90.76 pg/10 ⁹		414 – 499 pg	EM + Ca ²⁺ [500 µM]	
	27.5 pg/10 ⁹		126 – 151 pg	Ca ²⁺ [500 µM]	
Monocitos	1 µg/10 ⁹	190-710 x 10 ³	190 – 710 pg	LPS	Endo, 2014
Macrófagos	300 ng/10 ⁹			LPS	Endo, 2014
Plaquetas	1.7 ng/ml prp 4.8 ng/10 ⁹	157-407 x 10 ⁶	0.7 – 1.9 ng	ADP	Smith, 1973
	2.4 ng/ml prp 6.7 ng/10 ⁹		1.1 – 2.7 ng	Epinefrina	Smith, 1973
	3.5 -4.3 ng/ml prp 9.8 ng/10 ⁹		1.5 – 3.9 ng	Colágena	Smith, 1973
	12 ng/10 ⁹		1.9 – 4.9 ng		Silver, 1972
	21 ng/10 ⁹		3.2 – 8.5 ng		Linke et al, 2017
	8.8 ng/ml prp 24.8 ng/10 ⁹		3.8 – 10 ng	Trombina	Smith, 1973

Pg-picogramo; µg-microgramo; ng-nanogramo; EM-estrés mecánico; LPS-lipopolisacárido; prp-plasma rico en plaquetas. Los datos obtenidos de las publicaciones originales fueron ajustados a unidades equivalentes para facilitar la comparación. Los datos de intervalos de referencia de conteo celular/ml de sangre total para calcular la producción de PGE₂ fueron tomados de: Díaz-PP, (2012) [82].

1.9 Plaquetas

Las plaquetas son pequeñas células anucleadas que fueron descubiertas por Giulio Bizzozero [37]. Son las células circulatorias más pequeñas; tienen un diámetro de 2-4 µm y un volumen celular de 6-10 fL. Su vida media es de 7-10 días y se degradan en el sistema retículoendotelial en hígado y bazo, o por apoptosis. En individuos sanos se pueden encontrar de 150,000 a 350,000 plaquetas/ µl de sangre periférica, y diariamente son producidas unas 1 x 10¹¹ plaquetas [38-40].

1.9.1 Generación de plaquetas

Los megacariocitos son células poliploides que se desarrollan en la médula ósea a partir de células troncales y dan origen a las plaquetas; debido a ello éstas fueron mucho tiempo consideradas como restos citoplasmáticos de los megacariocitos [37, 38, 40, 41]. Actualmente existen tres mecanismos propuestos para la generación de plaquetas: a) la fragmentación citoplasmática vía el Sistema de Demarcación Membranal (DMS); donde el DMS define compartimentos del tamaño de una plaqueta dentro del citoplasma del megacariocito, que luego se separan; b) el Modelo de gemación, en el cual las plaquetas se forman como pequeñas protuberancias en la periferia del megacariocito y c) el Modelo de formación de proplaquetas, que propone la formación de estructuras intermediarias a partir de largas extensiones citoplasmáticas del grosor de una plaqueta, que se liberan en forma de proplaquetas que dan lugar a preplaquetas, y finalmente a plaquetas individuales (Figura 3) [37, 42]:

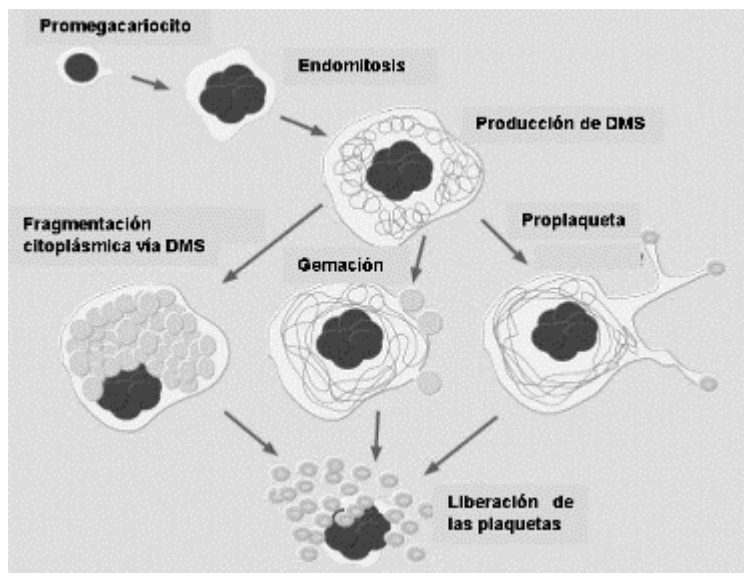


Figura 3. Mecanismos propuestos para la producción de plaquetas. DMS-sistema de demarcación membranar. Modificada de Italiano & Hartwig, (2013) [42].

1.9.2 Estructura plaquetaria

En la estructura de una plaqueta pueden distinguirse 5 regiones morfológicas principales [39]:

- a) La membrana plasmática, una bicapa lipídica estándar que incluye proteínas, entre las que se encuentran más de 50 tipos de receptores.
- b) El sistema canalicular, una prolongación de la membrana plasmática dentro de la plaqueta.
- c) El sistema tubular denso: un remanente del retículo endoplásmico que secuestra Ca^{2+} para regular la actividad de enzimas como la fosfolipasa A_2 y la ciclooxigenasa.
- d) El citoesqueleto, compuesto por microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios, que participan los cambios morfológicos, la extensión de pseudópodos y la secreción o degranulación.
- e) Los gránulos se dividen en:
 1. Gránulos α (50-80/plaqueta); contienen proteínas que se sintetizan en los megacariocitos.
 2. Gránulos o cuerpos densos (2-7/plaqueta); almacenan moléculas endocitadas.
 3. Lisosomas; contienen enzimas como fosfatasa ácida, catalasa, arilsulfatasa, entre otras.

1.9.3 Función plaquetaria

A pesar de su tamaño y la ausencia de núcleo en su estructura, las plaquetas participan en procesos de diversa complejidad: despliegan receptores que al ser estimulados desencadenan complejas vías de señalización intracelular, inician y modulan respuestas inflamatorias y son capaces de sintetizar proteínas y de entrar en apoptosis. De manera general, las plaquetas tienen un rol fundamental en la hemostasia y también participan en procesos como la remodelación tisular, la inflamación, el control de infecciones virales y bacterianas, la angiogénesis, el

crecimiento tumoral y la metástasis. La variedad de funciones en las que participan se debe a su facilidad de interactuar entre ellas, con moléculas de matriz extracelular y con otras poblaciones celulares, como leucocitos y eritrocitos, gracias a la liberación de moléculas específicas [37, 41, 43].

1.10 Agregación plaquetaria, activación y especies reactivas de oxígeno

Las plaquetas humanas están críticamente implicadas tanto en la hemostasia normal como en la hemorragia y la trombosis patológicas [44]. Su participación en estos procesos está basada en su capacidad de agregarse. En la circulación sanguínea las plaquetas se encuentran en estado de “reposo” con una forma discoidal. Cuando ocurre algún daño al tejido vascular y las plaquetas entran en contacto y reconocen proteínas (factor de von Willebrand o vWF, colágena de matriz extracelular) o moléculas solubles (ADP, trombina, tromboxanos), se desencadena en ellas un conjunto de procesos que se denomina activación plaquetaria, entre los que resaltan [45]: a) la degranulación, que implica la liberación al medio del contenido de los gránulos plaquetarios, b) la activación de integrinas, como la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, que funciona como un receptor para el fibrinógeno y las proteínas de la matriz extracelular y c) cambios en las concentraciones de Ca^{2+} intraplaquetario, que es esencial para los procesos de señalización intracelular durante el proceso de activación plaquetaria [46].

Como consecuencia a los eventos iniciales de activación, se desencadena señalización intraplaquetaria a través de las vías PI3K/AKT, PLC y PKC que activa a la NOX2, una enzima que genera superóxido en un rango nanomolar, que puede ser liberado, permanecer dentro de la célula, o ser convertido a H_2O_2 . Tanto el superóxido como el H_2O_2 pueden modular la señalización celular y favorecer los procesos clave en la activación plaquetaria antes mencionados (Figura 4) [47].

Después de la activación, las plaquetas tienen la capacidad de activar a otras plaquetas y de adherirse unas a otras o a algún sustrato en sitios de daño vascular,

un proceso denominado agregación, que culmina con la formación de un coágulo hemostático.

Durante el proceso de activación y agregación plaquetaria, se liberan moléculas que están contenidas dentro de las plaquetas (degranulación) entre las que destacan el ADP, los tromboxanos y las prostaglandinas.

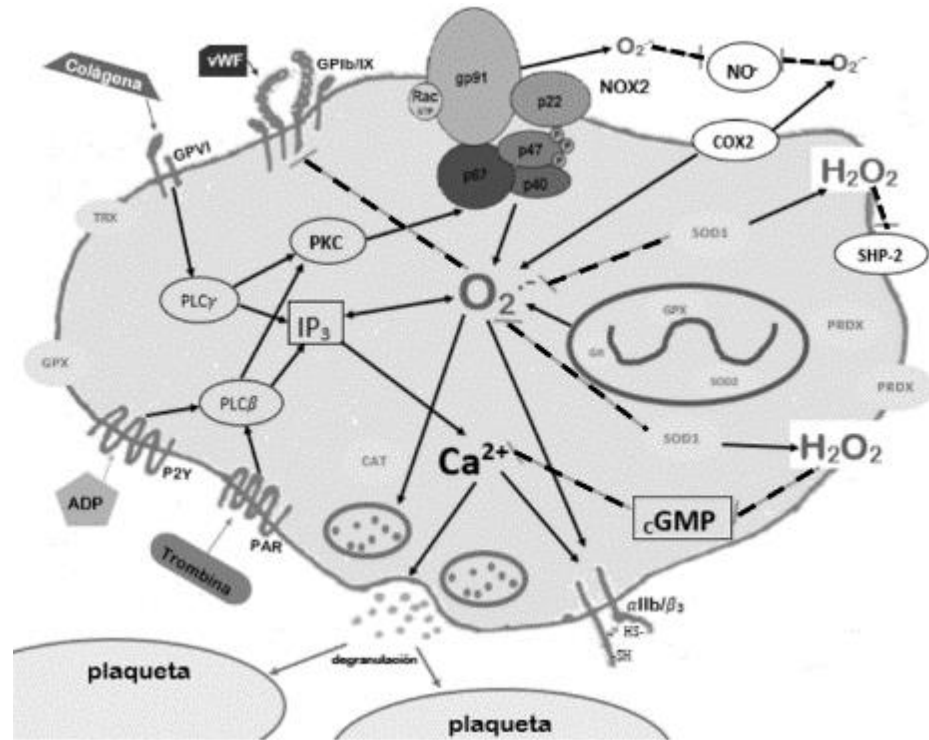


Figura 4. Producción de especies reactivas de oxígeno y su interacción con eventos de activación en plaquetas. Los agentes agonistas estimulan receptores membranales que a través de la vía de la PLC/PKC promueven el ensamble y la activación de NOX2, que produce superóxido, el cual puede salir de la célula e inactivar al óxido nítrico para favorecer la agregación, o permanecer dentro y ser convertido a H₂O₂ por la enzima SOD. El peróxido de hidrógeno a nivel de membrana puede inactivar fosfatasa y mediar la señalización intracelular. El O₂^{•-} y el H₂O₂ intervienen con los eventos involucrados con la activación plaquetaria, ya sea por inactivación directa o por alteración del equilibrio del Ca²⁺ intracelular. Flechas continuas indican regulación positiva; líneas punteadas señalan regulación negativa. SHP-2: proteína fosfatasa de tirosina con dominio SH2; PAR: receptor activado por proteasas; P2Y: quimiorreceptor purinérgico para adenosin difosfato. Modificada de Hernández-García, (2020) [47].

1.11 Secreciones plaquetarias como moduladores de la actividad de otros tipos celulares

La secreción de moléculas por las plaquetas es un evento fisiológico que favorece su participación en los procesos en los que se involucran (Apartado 1.9.3) y les permite también modular de manera indirecta la función de otros tipos de células, especialmente de leucocitos: las secreciones plaquetarias tienen efectos antiapoptóticos en eosinófilos, incrementan la producción de inmunoglobulinas por células B, favorecen el reclutamiento de monocitos de un modelo murino y disminuyen la producción de citocinas (TNF- α e IL-6) por macrófagos murinos; mediante la liberación de RANTES, PF4 y serotonina las plaquetas modulan la diferenciación y la activación de células T, y al secretar β -defensina 1 pueden inducir la formación de trampas extracelulares por neutrófilos (NETs) [48-53].

En adición a lo anterior, ha sido reportado que las plaquetas secretan PGE₂ como molécula mediadora para participar en procesos relacionados con:

- a) Sepsis en modelo murino, en el que la PGE₂ liberada por plaquetas inhibe la producción de TNF α e IL-6 por macrófagos, efecto mediado por la vía PGE₂/EP4, lo que se traduce en una reducción en la mortalidad de los animales bajo estudio [54] (Figura 5).
- b) Respuesta inflamatoria por monocitos, en los que la activación de las vías PGE₂/EP1, PGE₂/EP2 y PGE₂/EP4 incrementa la secreción de IL-10, misma que activa un proceso autócrino de inhibición de la producción y liberación de TNF α [55] (Figura 5).
- c) Cáncer de colon, en donde se promueve una regulación a la baja de la expresión de E-cadherinas (marcador de fenotipo epitelial) y un incremento en la expresión de Twist1 (factor de transcripción) mediante la activación de la vía PGE₂/EP4 en las células cancerígenas, efecto que favorece la transición del fenotipo epitelial al fenotipo mesenquimal, y que junto con otros tipos de señalización, promueve la metástasis [56] (Figura 5).

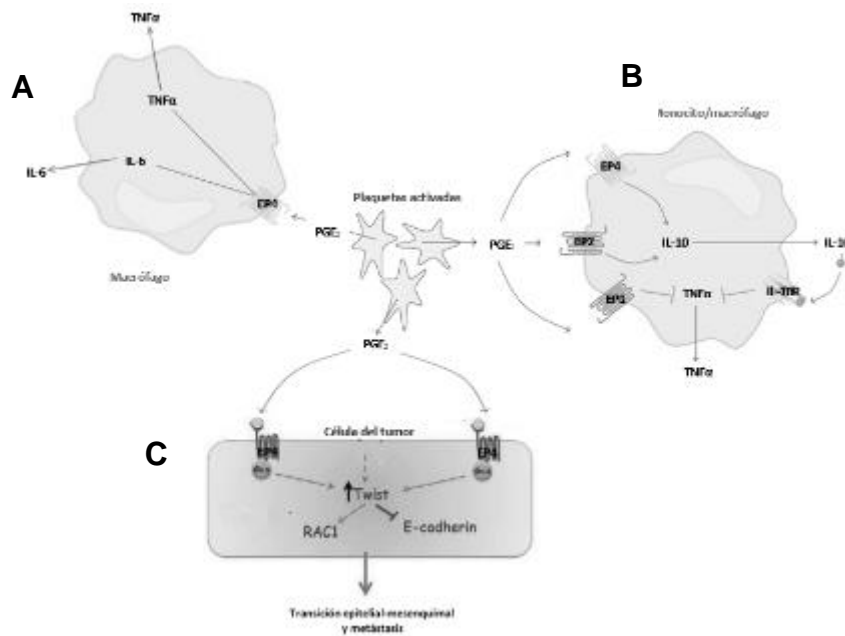


Figura 5. PGE₂ plaquetaria como modulador de la actividad celular. Señalización de PGE₂ proveniente de plaquetas activadas sobre A- Macrófagos murinos en condiciones de sepsis; B- Monocitos humanos y C- células de cáncer de colon. Modificado de Guillem-Llobat, 2016 y Linke, (2017) [55].

El efecto que las secreciones plaquetarias a nivel de moléculas específicas, como PGE₂, tienen sobre otros tipos de células constituye un área de interés que continúa aún bajo estudio.

2. ANTECEDENTES

Los efectos generados por exposición e intoxicación por plomo han sido estudiados y determinados para múltiples tipos celulares, que incluyen células germinales, hepatocitos, neuronas, linfocitos y eritrocitos [16, 17, 57-66].

En el caso de los eritrocitos, se conoce que la exposición a plomo resulta en alteraciones en el transporte y reserva de iones divalentes, afectaciones a la actividad de enzimas antioxidantes, generación de especies reactivas de oxígeno y eriptosis [1, 16, 17, 65, 67, 68].

En el laboratorio de Bioquímica Médica se ha estudiado *in vivo* una variedad de afectaciones al metabolismo de eritrocitos tras la exposición a plomo, usando como modelo eritrocitos de trabajadores crónicamente expuestos al metal. En su tesis doctoral, Aguilar-Dorado [69] reportó porcentajes de eriptosis significativamente mayores en trabajadores expuestos en comparación con trabajadores no expuestos al metal. Los eritrocitos de trabajadores intoxicados también presentaron diferencias en la lipoperoxidación, la fragilidad osmótica (Tabla 3), la concentración de Ca^{2+} intracelular (Tabla 4) y la actividad de calpaína, una proteasa relacionada con el proceso de apoptosis celular.

Tabla 3. Concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y fragilidad osmótica (OS₅₀) en eritrocitos de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo de un estudio previo.

Parámetros de daño y oxidación	No expuestos a plomo (n= 40)	Expuestos a plomo (n= 40)
TBARS (nmol MDA/ml)	0.47 ± 0.1	1.1 ± 0.3
[GSH] (μM)	1179 ± 238	809 ± 124
[GSSG] (μM)	30.3 ± 6.1	32.4 ± 8.9
GSH/GSSG	39.3 ± 6.0	26.4 ± 6.8
OS₅₀ (mOsm)	163 ± 6.2	178 ± 6.6

Los valores son la media ± SD. *P < 0.0001, según t-student. Tomada de Aguilar-Dorado (2016) [69].

Dentro de los parámetros evaluados por Aguilar-Dorado [69], se encontraron incrementos significativos en la concentración de PGE₂ tanto en sangre total como en la fracción eritrocitaria de trabajadores expuestos (Tabla 4), por lo que propuso que se encuentra involucrada en el proceso de eritrosis derivado de intoxicación por plomo.

Tabla 4. Concentración de plomo en sangre, actividad de δ -ALAD, lipoperoxidación, concentración de calcio intracelular ([Ca²⁺]_i) libre y concentración de PGE₂ en eritrocitos de pacientes no expuestos y expuestos a plomo de un estudio previo.

Parámetros de intoxicación por plomo	No expuestos a plomo (n = 15)	Expuestos a plomo (n = 15)
[Plomo en sangre] (μ g/dl)	4.7 \pm 1.0	68 \pm 4.6*
TBARS (nmol MDA/ml)	0.55 \pm 0.15	0.99 \pm 0.28*
ALA D (nmol/h/ml)	736 \pm 167	254 \pm 74*
[Ca²⁺]_i (nM)	73.1 \pm 5.6	101 \pm 20*
PGE₂ (pg/ml)	0.33 \pm 0.16	0.99 \pm 0.18*

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

Tomada de Aguilar-Dorado (2016) [69].

La PGE₂ ha sido relacionada con la inducción de apoptosis en fibroblastos, células corticales y mastocitos (Apartado 1.7) en los que activa eventos de las vías extrínseca e intrínseca [25]. En eritrocitos se ha reportado que su exposición a concentraciones elevadas de este mediador desencadena la activación de canales catiónicos que permiten el influjo de Ca²⁺, provocando con ello un desequilibrio osmótico que estimula la externalización de fosfatidilserina y además promueve la actividad de la μ -calpaína, una proteasa de componentes de citoesqueleto [20, 31, 32].

Los eritrocitos son capaces de sintetizar PGE₂ endógena en respuesta a estrés osmótico [20, 70], misma que podría mediar el proceso antes mencionado, sin embargo, se acepta la existencia de receptores o moléculas de interacción específicas para esta prostaglandina en la membrana eritrocitaria [71], lo que podría sugerir que también se encuentra involucrada PGE₂ proveniente de otras fuentes como las plaquetas o leucocitos, poblaciones en frecuente interacción con los eritrocitos y que cuentan con toda la maquinaria biológica para sintetizar y liberar esta prostaglandina en respuesta a estímulos determinados [20].

3. JUSTIFICACIÓN

La exposición e intoxicación con metales pesados representa un problema de salud pública a nivel mundial. México se encuentra entre los cinco primeros países productores de plomo en el mundo (International Lead Association, 2019); pero debido a los bajos porcentajes de reciclamiento del metal, a la poca vigilancia del cumplimiento de la normatividad y a la deficiente aplicación de procedimientos de protección en varios de los procesos, nos enfrentamos en el país a un sistema industrial con un incorrecto manejo del plomo en las diferentes escalas de procesamiento. Como consecuencia, existe contaminación que afecta a trabajadores de la industria y a los habitantes de núcleos poblacionales que comparten recursos ambientales con las industrias que utilizan plomo en sus procesos.

Un organismo intoxicado por plomo presenta manifestaciones clínicas dependientes del grado de intoxicación, que generalmente incluyen: cólicos abdominales, vómito, diarrea, anorexia, insomnio, irritabilidad, dolor de cabeza, pérdida de memoria a corto plazo, hipertensión, disminución o anomalías en espermatozoides, afectaciones al desarrollo intelectual, encefalopatía, entre otras [2, 72] .

Se ha reportado que la intoxicación por plomo provoca daño renal y vascular y a nivel molecular está ligada al daño a proteínas e incremento de eriptosis [17, 73]. No obstante, el mecanismo molecular de este último fenómeno no se conoce en su totalidad. Se ha propuesto que de manera conjunta podrían participar mediadores como la PGE₂ que se presenta en niveles elevados en muestras de sangre de trabajadores crónicamente expuestos, y que podría provenir de plaquetas activadas en intoxicación con plomo [69].

Entender la participación de las plaquetas y de moléculas biológicas mediadoras (PGE₂) en el proceso de eriptosis inducida por intoxicación por plomo, permitirá ampliar el conocimiento del mecanismo molecular de daño al organismo, lo que

podría traducirse en la generación de alternativas específicas para la prevención y tratamiento de la eriptosis en personas intoxicadas por plomo.

4. HIPÓTESIS

La intoxicación por plomo genera estrés oxidativo en las plaquetas, que al activarse liberan PGE₂, la cual induce el proceso de eriptosis reportado en trabajadores expuestos al metal.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la incubación y exposición a plomo sobre el estrés oxidativo en plaquetas y la producción de PGE₂ como mediador de la eriptosis en trabajadores intoxicados por plomo.

5.1 *Objetivos específicos*

-Definir las condiciones de un modelo *in vitro* de plaquetas para estudiar los efectos del plomo sobre el estrés oxidativo y su relación con la secreción de prostaglandinas.

-Analizar si la exposición a plomo genera estrés oxidativo en plaquetas.

-Estudiar *in vitro e in vivo*, el efecto de la exposición y la intoxicación por plomo sobre la agregación plaquetaria.

-Examinar si existe un factor en plasma de trabajadores intoxicados por plomo capaz de inducir apoptosis en eritrocitos de personas clínicamente sanas.

-Identificar si la vía de síntesis y liberación de PGE₂ es un mecanismo activado por plaquetas en respuesta a la exposición a plomo.

-Estudiar si la PGE₂ proveniente de plaquetas participa como mediador en la eriptosis por exposición a plomo.

6. METODOLOGÍA

6.1 Estrategia experimental

Se presenta la estrategia abordada para cumplir cada objetivo propuesto.

- Definir las condiciones de un modelo *in vitro* de plaquetas para estudiar los efectos del plomo sobre el estrés oxidativo y su relación con la secreción de prostaglandinas.
- Analizar si la exposición a plomo genera estrés oxidativo en plaquetas.
 - i Incubar plaquetas de voluntarios sanos con $Pb(NO_3)_2$ y determinar el efecto sobre:
 - Actividad de la enzima catalasa
 - Generación de anión superóxido
 - Lipoperoxidación (Generación de malondialdehído)
 - ii Determinar en plaquetas obtenidas a partir de sangre de trabajadores expuestos, en condición de reposo o activadas con ADP.
 - Actividad de la enzima catalasa
 - Generación de anión superóxido
 - Lipoperoxidación (Generación de malondialdehído)
 - Generación de H_2O_2
 - Concentración de NADPH
- Estudiar *in vitro* e *in vivo*, el efecto de la exposición y la intoxicación por plomo sobre la agregación plaquetaria.
 - i *In vitro*: incubar plaquetas de voluntarios clínicamente sanos con $Pb(NO_3)_2$ a diferentes concentraciones, estimular con ADP y evaluar la agregación.
 - ii *In vivo*: obtener muestras de trabajadores expuestos a plomo y evaluar agregación plaquetaria utilizando ADP como agonista.
- Examinar si existe un factor en plasma de trabajadores intoxicados por plomo capaz de inducir eritrosis en eritrocitos de personas clínicamente sanas.
 - i Conformar un grupo de trabajadores crónicamente expuestos a plomo y determinar parámetros de intoxicación:

- Concentración de plomo en sangre
- Actividad de δ -ALAD
- ii Incubar eritrocitos de voluntarios clínicamente sanos con plasma de trabajadores intoxicados por plomo y analizar el efecto sobre:
 - Externalización de fosfatidilserina como marcador de eriptosis.
- Identificar si la vía de síntesis y liberación de PGE₂, es un mecanismo activado por plaquetas en respuesta a la exposición a plomo.
 - i *In vivo*: cuantificar la concentración de PGE₂ en plasma de trabajadores crónicamente expuestos a plomo.
- Estudiar si la PGE₂ proveniente de plaquetas participa como mediador en la eriptosis por exposición a plomo.
 - i Incubar eritrocitos de voluntarios clínicamente sanos con sobrenadantes de plaquetas expuestas a plomo, en reposo y activadas, y determinar el efecto sobre:
 - Externalización de fosfatidilserina
 - ii Pre-incubar plaquetas con ácido acetilsalisílico (AAS), inhibidor de la vía de síntesis (COX) de PGE₂; exponerlas a plomo y recuperar sobrenadantes de plaquetas en reposo y activadas para incubar eritrocitos de voluntarios clínicamente sanos y observar efecto sobre:
 - Externalización de fosfatidilserina

6.2 Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre de voluntarios clínicamente sanos y de trabajadores expuestos a plomo por punción venosa del brazo asistida con sistema de aguja y adaptador para tubos "Vacutainer" con vacío. El anticoagulante utilizado fue citrato de sodio 0.109M (3.2%).

6.3 Determinación de la concentración de plomo en sangre total

A 100 μ L de sangre total se añadió una solución de cloruro de cromo 1.07%, ion mercurio 0.0028% y acetato de cadmio 1.43%. Las muestras se incubaron durante

una hora a temperatura ambiente para permitir la solubilización del plomo contenido en las células de la muestra. La determinación de la concentración de plomo se realizó por duplicado en un analizador de plomo modelo 3010 B (ESA), previamente calibrado con estándares de concentraciones conocidas de plomo. Los valores obtenidos se reportaron en $\mu\text{g/dL}$ [17, 74].

6.4 Determinación de la actividad de d-ALAD

La determinación se llevó a cabo conjugando métodos antes descritos [75-77]. Se tomaron alícuotas de 100 μL de sangre total o 100 μL de buffer de fosfato-citrato para el blanco. Se adicionaron 350 μL de tritón X-100 al 0.24% para lisar los eritrocitos, y después de homogeneizar en vórtex se agregaron 250 μL de ALA (ácido aminolevulínico) 20 mM. Los tubos se incubaron en baño María durante 1 hora a 37°C. Terminada la incubación, se añadió 625 μL de ácido tricloroacético al 10% para detener la reacción y se centrifugaron los tubos a 857xg durante 10 minutos. A 750 μL del sobrenadante obtenido se añadió 750 μL de reactivo de Ehrlich. Tras 10 minutos de incubación en oscuridad, la absorbancia de las muestras se determinó a 555 nm. La actividad enzimática se expresó en nmol/h/mL de glóbulos rojos.

6.5 Obtención de plaquetas

Para cada ensayo o condición experimental, se utilizaron plaquetas obtenidas a partir de plasma rico en plaquetas (PRP), proveniente de 4.5 mL de sangre total con citrato. El PRP se obtuvo por centrifugación a 187xg durante 5 min, luego se centrifugó a 95xg/5 min para sedimentar eritrocitos contaminantes, se recuperó el sobrenadante, y finalmente se precipitaron las plaquetas por centrifugación a 1,000xg/20 min. Las plaquetas se resuspendieron en los amortiguadores que se indican para cada determinación. Para los experimentos en que fue necesario, se prepararon mezclas de PRP obtenido a partir de muestras de sangre de voluntarios clínicamente sanos con el mismo grupo sanguíneo.

6.6 Activación de plaquetas

Las muestras de plaquetas fueron activadas inmediatamente después de aislarse (para experimentos *in vivo*) o en cuanto se concluyeron los tiempos de incubación con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (para experimentos *in vitro*) añadiendo a la suspensión plaquetaria, o al plasma rico en plaquetas el volumen correspondiente de una solución de ADP 1 mM para alcanzar en el medio en que las plaquetas se encontraban una concentración final de 10 μM de ADP, las plaquetas se resuspendieron y de inmediato se procedió a tratarlas como corresponde a cada determinación.

6.7 Incubación de plaquetas con plomo

Para ensayos *in vitro* de actividad de catalasa, lipoperoxidación y liberación de anión superóxido se recuperó plasma rico en plaquetas de 3 o 4 donadores clínicamente sanos del mismo tipo sanguíneo para integrar un "pool" suficiente para ensayar todas las condiciones. A las plaquetas obtenidas se añadió amortiguador de Tyrode (134 mM NaCl, 12 mM NaHCO_3 , 2.9 mM KCl, 0.34 mM Na_2HPO_4 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 5 mM Dextrosa, pH 7.4) que contenía la concentración de nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) correspondiente a cada condición (0.4, 4 y 40 μM). Se realizó un curso temporal a 37°C en baño maría durante el tiempo que se indica en cada ensayo. Después de las incubaciones, las muestras fueron tratadas conforme al protocolo correspondiente.

6.8 Determinación de la actividad de la enzima catalasa en plaquetas

Para ensayos *in vitro*: Después del periodo de incubación de plaquetas con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, los tubos fueron centrifugados a 1,000xg/20 min para sedimentar las plaquetas y desechar el sobrenadante que contiene nitrato de plomo. Para ensayos *in vivo*: se obtuvieron plaquetas a partir de sangre total de trabajadores expuestos a plomo o de voluntarios clínicamente sanos.

Posterior a un lavado con amortiguador salino de fosfatos a 1,000xg/20 min, se añadió a los tubos Tritón X-100 0.1% y se les sometió a dos ciclos de congelación

con nitrógeno líquido y descongelación a temperatura ambiente. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12,000xg/30 min para recuperar el sobrenadante, en donde se evaluó la actividad de la enzima monitoreando la descomposición de H₂O₂ usado como sustrato por la disminución de la absorbancia a 240 nm. La actividad de la enzima se expresó en U/g de proteína plaquetaria.

6.9 Determinación de liberación de anión superóxido por plaquetas

Para ensayos *in vitro*: Después del periodo de incubación de plaquetas con Pb(NO₃)₂, los tubos fueron centrifugados a 1,000xg/20 min para sedimentar las plaquetas y desechar el sobrenadante que contiene nitrato de plomo. Para ensayos *in vivo*: se obtuvieron plaquetas a partir de sangre total de trabajadores expuestos a plomo o de voluntarios clínicamente sanos. Tras un lavado con amortiguador salino de fosfatos a 1,000xg/20 min, se determinó la liberación de anión superóxido siguiendo el método propuesto por Jahn en 1990 [78], con algunas modificaciones: se añadió a cada tubo 400 µl de Solución de Citocromo C (Citocromo C 160 µM en amortiguador de Tyrode) y 400 µl de amortiguador de Tyrode. Los tubos se incubaron durante 30 min/37°C, y luego se centrifugaron a 2,000xg/5 min. Se recuperó el sobrenadante para determinar la absorbancia a 550 nm. La concentración de anión superóxido se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar 18,700 M⁻¹ cm⁻¹ y se expresó en µmol de superóxido/g de proteína plaquetaria.

6.10 Determinación de la lipoperoxidación en plaquetas

Para ensayos *in vitro*: Después del periodo de incubación de plaquetas con Pb(NO₃)₂, los tubos fueron centrifugados a 1,000xg/20 min para sedimentar las plaquetas y desechar el sobrenadante que contiene nitrato de plomo. Para ensayos *in vivo*: se obtuvieron plaquetas a partir de sangre total de trabajadores expuestos a plomo o de voluntarios clínicamente sanos. Tras un lavado con amortiguador salino de fosfatos a 1,000xg/20 min) se determinó la generación de malondialdehído (MDA) de acuerdo a Wachowicz (2002) [79].

Se añadió a cada tubo 500 µl de amortiguador de Tyrode y 500 µl de solución de ácido tricloroacético (20% en 0.6 M HCl), y tras un periodo de incubación de 2 h/4°C en cama de hielo, se centrifugaron a 1,200xg/15 min. A 900 µl de sobrenadante se añadieron 180 µl de solución de ácido tiobarbitúrico (0.12 M en Tris 0.26 M, pH 7.0) y las muestras fueron sumergidas en baño de agua en ebullición durante 15 min. Se determinó la absorbancia a 532 nm y los resultados se expresaron como nmol MDA/g de proteína plaquetaria.

6.11 Peróxido de hidrógeno producido en plaquetas

Se utilizó el método de Pick y Keisari (1981) [80], con ajustes para utilizarse en plaquetas. Plaquetas obtenidas a partir de un tubo de sangre total de trabajadores expuestos a plomo o de voluntarios clínicamente sanos, fueron resuspendidas en Tritón X-100 y posteriormente se añadió a cada tubo 1 ml de solución de rojo de fenol (NaCl 140 mM, amortiguador de fosfatos de potasio 10 mM, dextrosa 5.5 mM, rojo de fenol 0.28 mM y 15 U/mL de peroxidasa de rábano, pH 7.0) recién preparada. Se llevaron los tubos a una incubación a 37°C/ 15 min y tras una centrifugación a 2,000xg/5 min, se añadieron al sobrenadante 10 µl de NaOH 1N y se determinó la absorbancia a 610 nm. La concentración de peróxido de hidrógeno en la muestra se determinó por comparación con una curva estándar. Los resultados se expresaron como nmol de H₂O₂/mg de proteína plaquetaria.

6.12 Concentración de NADPH en plaquetas

Se determinó de acuerdo al método propuesto por Veskokis (2018) [81], con ajustes para usarse en plaquetas. Plaquetas obtenidas a partir de un tubo de sangre total de trabajadores expuestos a plomo o de voluntarios clínicamente sanos fueron resuspendidas en 200 µl de amortiguador de extracción (nicotinamida 20 mM, NaHCO₃ 20 mM, Na₂CO₃ 100mM) y tras un ciclo de congelación con nitrógeno líquido y descongelación en baño de agua a 22°C, los tubos se centrifugaron a 16,000xg/1 min/4°C y se recuperaron 100 µl de sobrenadante que se incubaron 60°C/30 min/oscuridad e inmediatamente se colocaron en hielo antes de añadir 800

μL de amortiguador (Tris-HCl 100 mM, MTT 0.5 mM, phenazina ethosulfato 2 mM, Na₄EDTA 5 mM, 1.3 mU/mL G6-PD a pH 8.0) frío, recién preparado. Los tubos se incubaron a 37°C/5 min, y tras la adición de 100 ul de G6-P 10 mM el cambio en la absorbancia a 570 nm fue monitoreado durante 2 min. La concentración de NADPH fue calculada utilizando el coeficiente de extinción molar del formazán (13 L/mmol/cm). La concentración de NADPH se reportó en pmol NADPH/mg de proteína plaquetaria.

6.13 Determinación de concentración de PGE₂ en plasma de trabajadores crónicamente expuestos a plomo

Para cuantificar los niveles de PGE₂ en plasma de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo se obtuvieron muestras de sangre utilizando tubos “vacutainer” que contienen EDTA como anticoagulante. El plasma se recuperó por centrifugación de las muestras a 1,160xg/10 min e inmediatamente fue congelado a -20°C hasta que las determinaciones fueron realizadas (12 h después). Para las determinaciones se utilizó el Kit Parameter PGE₂ Assay de R&D System(Cat. KGE004B), basado en un ensayo de ELISA variante sándwich. Todo el procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de PGE₂ se reportaron en pg/ml.

6.14 Incubación de eritrocitos con sobrenadantes de plaquetas.

Eritrocitos obtenidos de sangre total de donadores voluntarios clínicamente sanos fueron lavados 3 veces con amortiguador salino de fosfatos, y posteriormente incubados a un hematocrito de 3% a 37°C durante los tiempos que en cada experimento se indican con los sobrenadantes obtenidos (por centrifugación a 25xg/2 min tras activación) de:

- a) Plaquetas de donadores clínicamente sanos, en reposo o activadas con ADP 10μM.

- b) Plaquetas de donadores clínicamente sanos, incubadas con ácido acetilsalicílico 1 mM 37 °C/30 min, lavadas y resuspendidas en amortiguador salino de fosfatos para ser activadas o no con ADP 10 µM.
- c) Plaquetas de donadores clínicamente sanos previamente incubadas con nitrato de plomo 40 µM a 37°C/2 h, lavadas y resuspendidas en amortiguador salino de fosfatos para ser activadas o no con ADP 10µM.
- d) Plaquetas de donadores clínicamente sanos, incubadas con ácido acetilsalicílico 1 mM 37°C/30 min, posteriormente con nitrato de plomo 40 µM a 37°C/2 h, y luego activadas o no con ADP 10µM.

Al terminar la incubación, los tubos se centrifugaron (1,160xg/5 min), se desechó el sobrenadante y los eritrocitos se lavaron con amortiguador salino de fosfatos (1,160xg/5 min) para ser utilizados para las correspondientes determinaciones.

6.15 Análisis de externalización de fosfatidilserina en eritrocitos

Para medir eriptosis utilizando como marcador el porcentaje de externalización de fosfatidilserina, el paquete celular eritrocitario se diluyó 600 veces (v/v) en amortiguador salino de fosfatos, 200 ul de la dilución fueron marcados con 1 µL de AnexinaV-FITC (concentración final 100 nM), y tras 5 min de reposo se colocó en los tubos el amortiguador de unión (Hepes 10mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM, pH 7.5). Los eritrocitos se lavaron 3 veces (857xg/1 min) con amortiguador de unión y las muestras se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Calibur; Becton-Dickinson) para detectar la intensidad de fluorescencia de la anexinaV-FITC con valores de excitación a 488 nm y de emisión a 530 nm [17]. Los resultados se reportaron como porcentaje de externalización de fosfatidilserina.

6.16 Incubaciones conjuntas de eritrocitos, plomo y plaquetas.

Plaquetas obtenidas de un tubo de sangre total con citrato de donadores clínicamente sanos fueron incubadas con eritrocitos y diferentes concentraciones de Pb(NO₃)₂ como se indica en cada figura y descripción, a 37°C/2 h y

posteriormente a 4°C/24h. Terminadas ambas etapas de la incubación se recuperaron los eritrocitos por centrifugación, se lavaron dos veces con amortiguador salino de fosfatos y se procesaron para determinar niveles de eriptosis por externalización de fosfatidilserina.

6.17 Incubación de eritrocitos con plasma de trabajadores intoxicados.

Eritrocitos obtenidos de sangre total de voluntarios clínicamente sanos fueron lavados 3 veces con PBS (1,160xg/5 min), e incubados a 4°C/24 h con el plasma obtenido por centrifugación (1,160xg /10 min) de 6 ml de sangre total de trabajadores expuestos a plomo, a un hematocrito de 1%. Terminada la incubación, los eritrocitos se separaron por centrifugación para determinar la externalización de fosfatidilserina como se indica en el apartado 6.15.

6.18 Ensayos de agregación plaquetaria en plasma rico en plaquetas.

Muestras de sangre total anticoaguladas con citrato de sodio 0.109M (3.2%) de trabajadores expuestos a plomo y de voluntarios clínicamente sanos fueron centrifugadas (1,000 rpm/5 min) para recuperar plasma rico en plaquetas (PRP) y recentrifugadas (4,000 rpm/20 min) para obtener plasma pobre en plaquetas (PPP). Se utilizaron 500 ul de PRP ajustado a 2.5×10^3 plaquetas/ μ L. Tras una incubación de 3 min en un lumiagregómetro (Modelo 560 CA 810 AGGRO/LINK Chronolog, USA), se indujo la agregación con ADP10 μ M como agente agonista. Los resultados se reportan en porcentaje de agregación. Los ensayos de agregación plaquetaria fueron realizados en el Laboratorio de Trombosis y Fibrinólisis del Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

6.19 Ensayos de agregación plaquetaria en sangre total.

Una muestra de 500 uL de sangre total, anticoagulada previamente con citrato de sodio 0.109M (3.2%), de trabajadores expuestos a plomo y de voluntarios clínicamente sanos, fue diluida (1:1) con solución salina y analizada utilizando el

método de agregación plaquetaria en sangre total o impedancia, que mide la impedancia eléctrica entre dos electrodos tras la adición de un agente agonista, ADP 10 μ M, usando un lumiagregometro (Modelo 560 CA 810 AGGRO/LINK Chronolog, USA); los resultados se reportaron como amplitud de impedancia (ohms).

7. RESULTADOS

7.1 Grupos de estudio

Para desarrollar el proyecto presentado se estableció una colaboración con el departamento de Investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío y con industrias que procesan plomo en el estado de Guanajuato, México.

De los 29 trabajadores expuestos a plomo, el 73% fueron hombres y el 27% mujeres, con edades entre 27-64 años (media=45 años) y una antigüedad laboral en la industria que varía entre 1-25 años (media=12 años).

Por otra parte, se estableció una colaboración con el Banco de Sangre del Hospital de Ticomán, para obtener muestras de sangre de personas clínicamente sanas 49% hombres y 51% mujeres con edades de 27-64 años, sin antecedentes laborales de exposición a metales pesados, y sin manifestaciones clínicas relacionadas con la intoxicación por plomo, para integrar el grupo: Trabajadores no expuestos a plomo.

A partir de muestras de sangre total obtenidas de ambos grupos, en tubos con citrato de sodio 0.109M (3.2%) como anticoagulante, se estandarizaron las condiciones de separación y manejo de las plaquetas para poder realizar los experimentos.

7.1.1 Marcadores de intoxicación por plomo

Para corroborar si la población de trabajadores expuestos a plomo estaba conformada por personas intoxicadas por el metal, se determinó para cada trabajador la concentración de plomo en sangre y la actividad de la enzima δ -ALAD, una enzima que es utilizada como un biomarcador de daño bioquímico por exposición a plomo. Para la realización de la prueba de la actividad de δ -ALAD se contó con el apoyo de la M. en C. Nadia C. López Vanegas. Después de analizar los resultados se encontró que la concentración de plomo en sangre es significativamente mayor en los trabajadores expuestos (58.3 ± 32.2 vs 2.5 ± 1.6 $\mu\text{g/dL}$); mientras que la actividad de δ -ALAD es significativamente menor (1082 ± 305

vs 264 ± 196 nmol/h/mL eritrocitos) en eritrocitos de los mismos trabajadores, en comparación con trabajadores no expuestos (Figura 6 A y B, respectivamente).

Los trabajadores expuestos tienen concentraciones de plomo en sangre por arriba de las indicadas por la NOM-047-SSA1-2011, que establece que para personas ocupacionalmente expuestas el límite superior es de $30 \mu\text{g/dL}$ de sangre, mientras que los trabajadores no expuestos a plomo tienen niveles en sangre por debajo de $5 \mu\text{g/dL}$, el límite superior para personas no expuestas ocupacionalmente según la NOM-199-SSA1-2000 (Figura 6, A). Además, se encontró una correlación entre la concentración de plomo en sangre y la actividad de δ -ALAD de ambos grupos de trabajadores ($r^2=0.63$, $p<0.0001$) (Figura 6, C).

Estos datos en conjunto con el análisis clínico realizado por el Dr. José Víctor Calderón Salinas (datos no mostrados), indican que los trabajadores expuestos de manera laboral a plomo son personas intoxicadas por el metal.

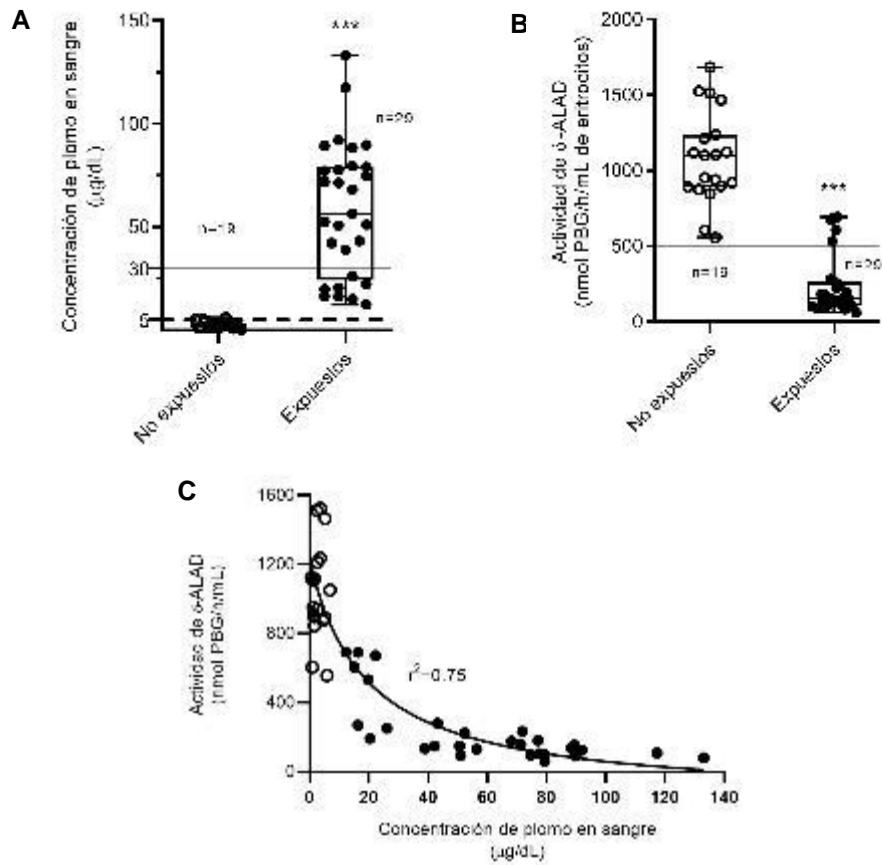


Figura 6. Boxplot de la concentración de plomo en sangre y actividad de δ -ALAD en trabajadores expuestos. Se determinó A) La concentración de plomo en sangre (con una línea punteada se marca el valor superior para personas no expuestas ocupacionalmente según la NOM-199-SSA1-2000 y con una línea gris el valor superior para personas expuestas ocupacionalmente según la NOM-047-SSA1-2011); B) Actividad de δ -ALAD (con una línea gris se marca la actividad considerada normal en una persona clínicamente sana); C) Gráfico de correlación entre la concentración de plomo en sangre y la actividad de δ -ALAD. n=29 y n=19 para trabajadores expuestos y no expuestos, respectivamente. *** Diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.001$ obtenida por prueba de Mann-Whitney.

7.1.2 Conteo plaquetario

Debido a que en este proyecto se realizaron experimentos basados en la función celular plaquetaria, se determinó el conteo de plaquetas en los trabajadores expuestos a plomo, y se encontró que el número de plaquetas en sangre se mantiene dentro de los rangos de referencia para personas de edad adulta sin enfermedades relacionadas con plaquetas [82] (Figura 7) .

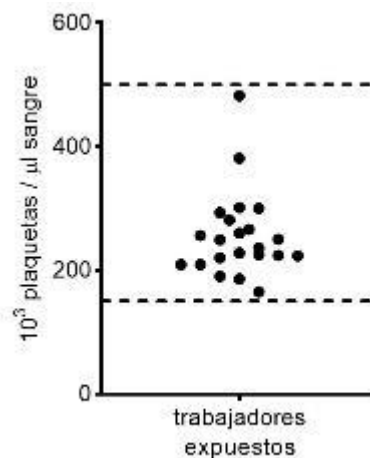


Figura 7. Gráfico de conteos plaquetarios en trabajadores expuestos a plomo. Con líneas punteadas se marca el rango de referencia para personas adultas. n=22

Con respecto a los trabajadores no expuestos, al tratarse de muestras provenientes de bancos de sangre con donadores clínicamente sanos, es posible considerar que tienen conteos plaquetarios dentro del rango de referencia, pues para que una persona pueda ser candidata a donar sangre, es necesario antes corroborar que sus conteos de células sanguíneas sean normales; sin embargo, no fue posible tener acceso a los conteos plaquetarios de cada donador individual debido a controles éticos y de protocolos de trabajo de los laboratorios y bancos de sangre involucrados.

7.2 Agregación plaquetaria

Una vez determinados ambos grupos de estudio y bajo el antecedente de que los trabajadores expuestos a plomo no presentan alteraciones en los conteos plaquetarios realizados, se decidió analizar si también se mantenía la integridad funcional de estas células determinando los porcentajes de agregación plaquetaria.

Los resultados se presentan en dos categorías: experimentos *in vitro*, que fueron realizados con diferentes estrategias que involucran plaquetas obtenidas a partir de muestras de trabajadores no expuestos, y experimentos *in vivo* en los que se incluyen determinaciones en ambos grupos de estudio.

7.2.1 Experimentos *in vitro*

En primer lugar se analizó la agregación en plaquetas de voluntarios clínicamente sanos que fueron incubadas con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Se eligió como agonista el ADP y después de al menos 3 ensayos preliminares utilizando concentraciones finales de 2 y 10 μM de ADP, se decidió que la concentración que mejor se ajustó a las condiciones con mayor activación fue 10 μM , por lo que se utilizó esa concentración para los siguientes experimentos.

Se determinó la agregación plaquetaria por método óptico; éste método permite determinar la función de plaquetas sin la presencia de otras células. Para esto, se realizó una curva concentración-respuesta de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0.4, 4 y 40 μM), y un curso temporal a temperatura ambiente donde al PRP ajustado se le adiciono la solución de plomo e inmediatamente (Tiempo cero de incubación (T_0)) o 30 min después, el agente agonista (ADP 10 μM). Debido al tiempo de viabilidad de las plaquetas no fue posible realizar incubaciones durante tiempos más prolongados. De acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia para la estandarización de la técnica, el intervalo de referencia de porcentajes de agregación con ADP 10 μM como agonista en muestras de individuos sanos establecido por el laboratorio es de 80-112% [83]. Los resultados se muestran en la tabla 5, en la que se observa que no se encontró diferencia estadística significativa en las condiciones del estudio mediante método óptico.

Tabla 5. Resultados obtenidos de la curva concentración-respuesta y curso temporal de la agregación plaquetaria (%) por método óptico, con ADP 10 μ M como agente agonista.

Medio de incubación		Agregación plaquetaria(%)	
		Tiempo de incubación (min)	
		0	30
Pb (NO ₃) ₂	0 μ M	92 \pm15	106\pm10
	0.4 μ M	92\pm17	102\pm14
	4.0 μ M	96\pm14	104\pm8
	40 μ M	93\pm15	105\pm8

Se muestra la media \pm DE. n=3 para 0 min y n=4 para 30 min de incubación. NS por prueba de Friedman. μ M-micromolar.

Posteriormente se realizaron experimentos de agregación mediante la técnica de impedancia, en la que además de las plaquetas se involucran los leucocitos y eritrocitos que también participan en el proceso de agregación. Para los experimentos con esta variante experimental se utilizan muestras de sangre total, por lo que fue posible realizar una curva concentración respuesta de Pb(NO₃)₂ (0.4, 4.0 y 40 μ M) y un curso temporal (tiempo 0, 30 y 360 min de incubación) a temperatura ambiente; con ADP 10 μ M como agente agonista. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6, donde se observa que no se obtuvo diferencia significativa en los valores de agregación plaquetaria en muestras incubadas con plomo con respecto a los valores obtenidos de muestras sin Pb(NO₃)₂.

Tabla 6. Resultados obtenidos de la curva concentración-respuesta y curso temporal de la agregación plaquetaria (ohms) por método de impedancia, con ADP 10µM como agente agonista.

Medio de incubación		Agregación (Ω)		
		Tiempo de incubación (min)		
		0	30	360
Pb (NO ₃) ₂	0 µM	6.6 ±1	6.0±2	5.6±1
	0.4 µM	3.4±1	4.3±4	-----
	4.0 µM	5.0±2	4.3±3	-----
	40 µM	4.6±1	6.6±4	4.0±2

Se muestra la media ± DE de los valores de agregación plaquetaria (Ω). Agonista: ADP 10 µM. n=5 para 0 min , n=3 para 30 min y n=6 para 360 min de incubación. NS por prueba de Friedman para 0 y 30 min de incubación. NS por prueba de Wilcoxon para 360 min de incubación. µM-micromolar

7.2.2 Agregación plaqueria en muestras de trabajadores expuestos a plomo

Además de los experimentos *in vitro*, se analizó el efecto que la exposición crónica a plomo tiene sobre los niveles de agregación plaquetaria en trabajadores expuestos a plomo. Para ello se utilizó la técnica de agregometría por método óptico y ADP 10 µM como agente agonista, y se encontró que los trabajadores expuestos presentan valores de agregación 30% menores que los trabajadores no expuestos a plomo, diferencia estadísticamente significativa (Figura 8). El grupo de trabajadores expuestos también presentó mayor dispersión en los valores individuales de agregación y el 75% de los trabajadores expuestos tuvo menor agregación plaquetaria que la totalidad de los trabajadores no expuestos.

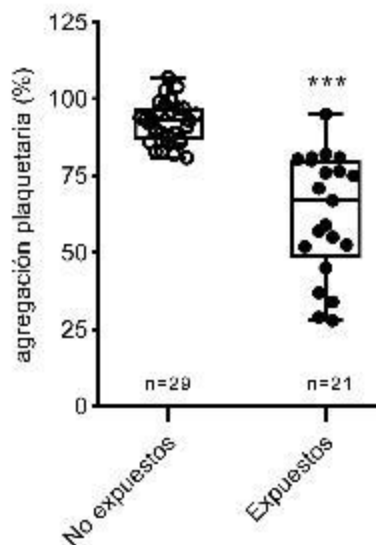


Figura 8. Boxplot de la agregación plaquetaria en trabajadores expuestos a plomo evaluada por agregometría. Método óptico, ADP 10 μ M como agonista. n=21 y n=29 para trabajadores expuestos y no expuestos, respectivamente. *** Diferencia estadísticamente significativa. p < 0.001 obtenida por prueba de Wilcoxon.

7.3 Estatus antioxidante plaquetario

Una vez establecido el efecto de la exposición a plomo sobre la agregación plaquetaria, se exploró del estatus antioxidante plaquetario, ya que se ha reportado que la generación de estrés oxidativo es uno de los mecanismos mediante los cuales el plomo daña a las células. Se eligieron tres marcadores para determinar si las plaquetas expuestas a plomo se encontraban bajo estrés oxidativo: 1) actividad de catalasa, una enzima que forma parte del sistema de defensa antioxidante celular, 2) lipoperoxidación, un parámetro que indica oxidación por especies reactivas o radicales libres a nivel de membrana celular y 3) liberación de superóxido, una especie reactiva de oxígeno que se involucra en procesos de oxidación intra y extracelular y en plaquetas favorece la agregación. Los experimentos fueron *in vitro* con plaquetas incubadas con diferentes concentraciones de Pb(NO₃)₂ o *in vivo* con plaquetas obtenidas a partir de muestras

de sangre de trabajadores crónicamente expuestos a plomo y trabajadores clínicamente sanos sin antecedentes de exposición.

7.3.1 Ensayos *in vitro*

Se abordó en primer lugar la fase *in vitro*. Para estos experimentos se utilizaron plaquetas no activadas aisladas de muestras de sangre de trabajadores clínicamente sanos sin antecedentes de exposición a plomo, algunas muestras fueron tomadas en el laboratorio de Bioquímica Médica, del Departamento de Bioquímica, CINVESTAV, y otras fueron proporcionadas por el banco de sangre del Hospital General Ticomán, CDMX.

7.3.1.1 Actividad de catalasa

Para determinar la actividad de la enzima catalasa, las plaquetas se incubaron bajo las condiciones descritas en el apartado 6.8, con dos concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Las concentraciones de ensayo fueron definidas con base en su equivalencia a concentraciones de plomo en sangre correspondientes a: intoxicación leve, para lo cual se eligió $0.4 \mu\text{M}$ (equivalente a $10 \mu\text{g/dL}$ de plomo en sangre), e intoxicación grave, para lo que se seleccionó $4 \mu\text{M}$ (equivalente $80 \mu\text{g/dL}$ de plomo en sangre). Concentraciones equivalentes a las seleccionadas fueron encontradas en muestras de trabajadores expuestos.

Una vez realizadas las determinaciones de actividad enzimática se encontró una gran variabilidad en los resultados obtenidos para cada condición, sin una diferencia estadística significativa entre la actividad de catalasa de las plaquetas incubadas y las no incubadas con plomo (Figura 9).

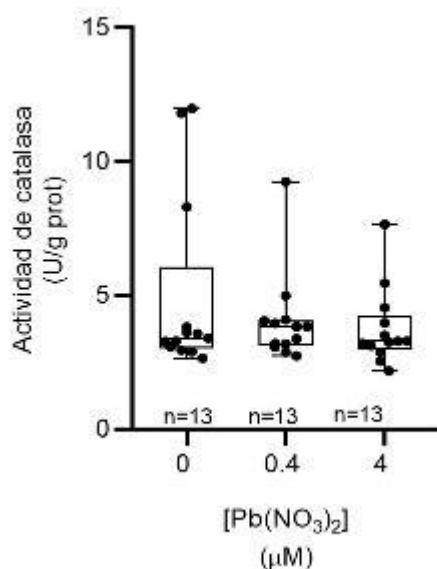


Figura 9. Boxplot de la actividad de catalasa en plaquetas incubadas con plomo. Plaquetas obtenidas de donadores no expuestos fueron incubadas con o sin solución de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0.4 o 4 μM) en amortiguador de Tyrode durante 60 min/ 37°C. Resultados de 13 determinaciones realizadas en “pool” de plaquetas de 3 donadores por cada repetición. NS por Prueba de Friedman .

7.3.1.2 Lipoperoxidación

Como marcador de estrés oxidativo se determinó la lipoperoxidación en plaquetas incubadas con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Para tratar de entender el efecto de una exposición aguda a plomo, en estos experimentos se usó una condición adicional: se añadió 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ al conjunto de concentraciones elegidas para la incubación de plaquetas.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la lipoperoxidación en plaquetas incubadas sin plomo y plaquetas incubadas a cualquiera de las tres concentraciones elegidas. En todas las condiciones, se observó una variación importante en los valores de lipoperoxidación (Figura 10).

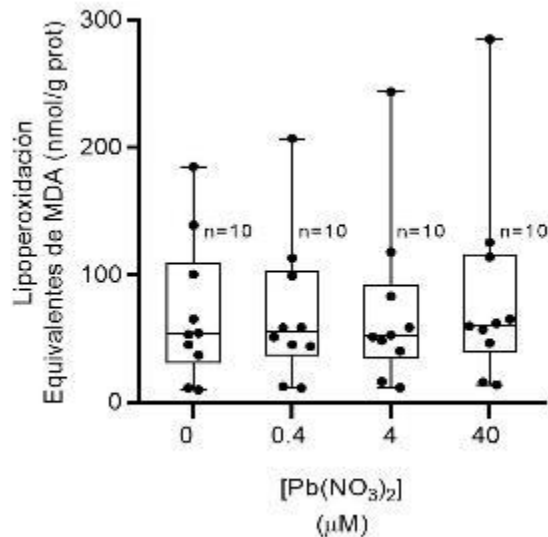


Figura 10. Boxplot de la lipoperoxidación en plaquetas incubadas con plomo. Plaquetas obtenidas de donadores no expuestos fueron incubadas con o sin solución de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0.4, 4 o 40 μM) en amortiguador de Tyrode durante 60 min/37°C. Resultados de 10 determinaciones realizadas en "pool" de plaquetas de 4 donadores por cada repetición. NS por Prueba de Friedman.

7.3.1.3 Liberación de superóxido

Otro marcador de estrés oxidativo evaluado *in vitro* fue la liberación de superóxido. Debido a que la liberación de superóxido está relacionada con el tiempo, se realizó inicialmente una curva representativa de tiempo (n=4) con plaquetas incubadas con 4 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, la concentración equivalente a intoxicación aguda en trabajadores expuestos (Figura 11, A). Con base en los resultados del curso temporal se eligió 60 min como el tiempo de incubación para los siguientes experimentos en los que se utilizaron plaquetas incubadas con 0.4, 4 y 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Tras el análisis de resultados de 10 experimentos independientes se encontró que las plaquetas que son incubadas con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ liberan mayores cantidades de superóxido que aquellas que no se exponen al metal. En la figura 11 se observa

que el 75% de las cantidades de superóxido liberadas por las plaquetas incubadas con plomo son mayores que el 50% de los valores encontrados en plaquetas incubadas sin plomo. El efecto se observa para todas las concentraciones de plomo utilizadas, desde la equivalente a intoxicación leve en trabajadores expuestos (Figura 11, B).

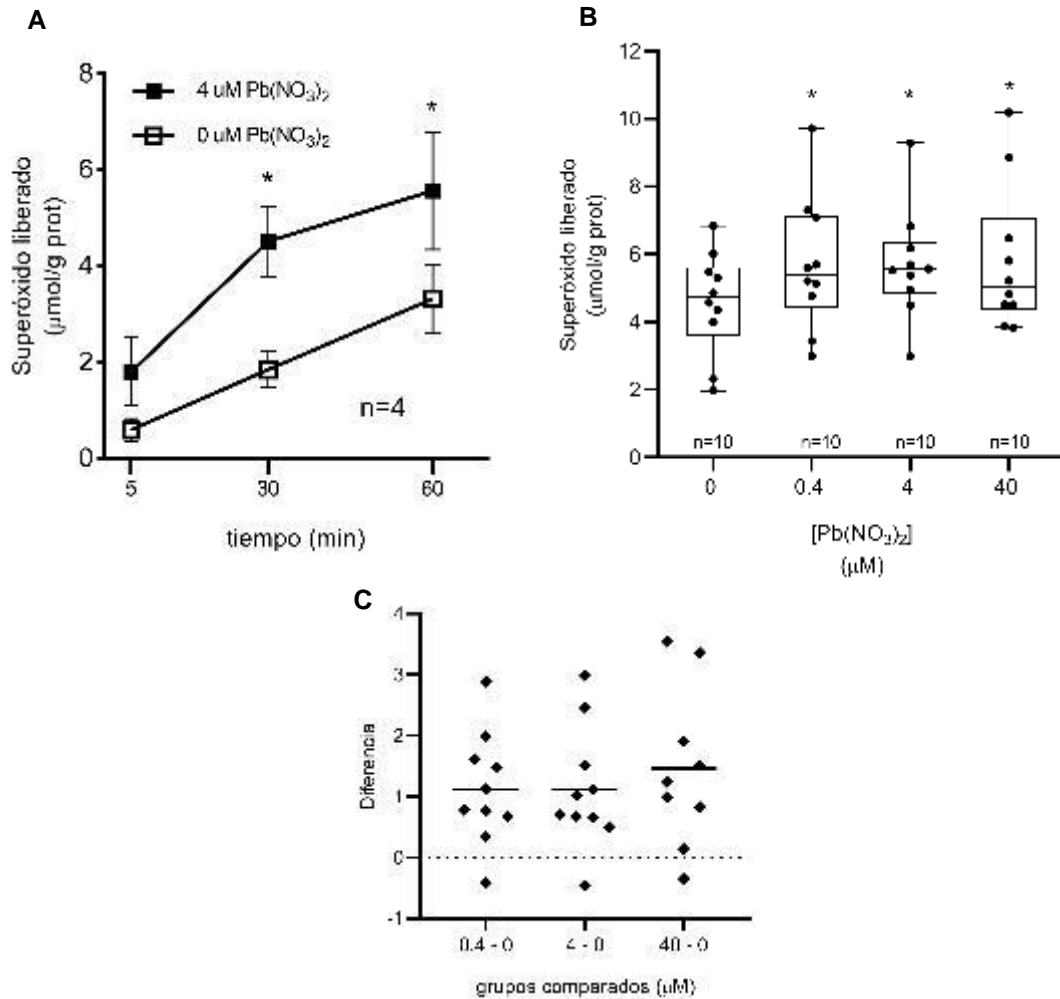


Figura 11. Boxplot de la liberación de superóxido por plaquetas incubadas con plomo. A- Curso temporal; B-Curva concentración-respuesta; C-Gráfico de diferencias del efecto observado entre concentraciones. Plaquetas obtenidas de donadores no expuestos fueron incubadas en amortiguador de Tyrode con: **A**- 4 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a 5, 30 y 60 minutos, se presenta la media \pm DE de determinaciones realizadas en "pool" de plaquetas de 3 donadores por cada repetición. * Diferencia significativa con respecto al control sin $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. $P < 0.05$ obtenida por prueba de t; **B**- 0.4, 4 o 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 60 minutos. Resultados de 10 determinaciones realizadas en "pool" de plaquetas de 4 donadores por cada repetición * Diferencia significativa con respecto al control sin $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $p < 0.05$ obtenida por prueba de Friedman.

7.3.2 Estatus antioxidante de plaquetas de trabajadores expuestos a plomo

También se determinó el estatus antioxidante de plaquetas obtenidas a partir de muestras de sangre de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo, para analizar si la respuesta antioxidante varía entre una incubación (experimentos *in vitro*) y una exposición crónica al metal (experimentos *in vivo*).

Para los experimentos *in vivo* se determinaron marcadores adicionales a los establecidos en la etapa anterior: la concentración de peróxido de hidrógeno, una especie reactiva de oxígeno que está relacionada tanto con otras ROS como con la actividad de enzimas antioxidantes y la concentración de NADPH + H⁺ (en adelante, NADPH), una de las principales moléculas del poder reductor de la célula, y que es utilizada como cofactor por enzimas antioxidantes.

Debido a que los marcadores de estatus antioxidante seleccionados están relacionados con procesos que ocurren tras la activación plaquetaria, éstos fueron determinados en plaquetas en reposo y también en plaquetas previamente activadas. Los resultados para cada marcador y estado plaquetario se detallan a continuación:

7.3.2.1 Actividad de la enzima catalasa

7.3.2.1.1 Actividad de catalasa en plaquetas en reposo

Para las plaquetas en reposo se encontró que el 75% de los trabajadores expuestos a plomo tienen una menor actividad de la enzima catalasa plaquetaria que el 75% de los trabajadores no expuestos. (Figura 12). Esta diferencia resultó estadísticamente significativa.

7.3.2.1.2 Actividad de catalasa en plaquetas activadas

Las determinaciones realizadas en plaquetas estimuladas con ADP 10 μ M muestran que la actividad de la enzima catalasa se incrementa significativamente ($p < 0.05$, $p < 0.0001$ por Mann-Whitney) en las plaquetas de los trabajadores de ambos grupos después de que las células son activadas. Al realizar el análisis estadístico entre actividad de catalasa de plaquetas activadas de ambos grupos, no se encontró una diferencia significativa entre la actividad de la enzima en plaquetas activadas de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo (Figura 12).

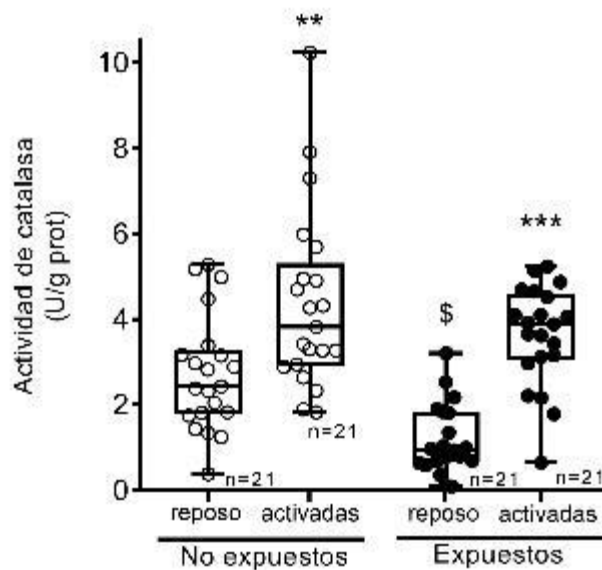


Figura 12. Boxplot de la actividad de catalasa en plaquetas activadas y en reposo de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo. n=21 para cada grupo de trabajadores en ambas condiciones. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto a plaquetas en reposo; \$ $p < 0.05$ comparado con plaquetas en reposo de trabajadores no expuestos obtenidas por Prueba de Mann-Whitney.

7.3.2.2 Lipoperoxidación

7.3.2.2.1 Lipoperoxidación en plaquetas en reposo

Lo datos obtenidos de plaquetas en reposo muestran que las plaquetas de los trabajadores expuestos a plomo tienen menores niveles de lipoperoxidación ($p < 0.05$) que las plaquetas de los trabajadores no expuestos al metal, un comportamiento que no ha sido reportado para otros tipos celulares (Figura 13).

7.3.2.2.2 Lipoperoxidación en plaquetas activadas

En plaquetas activadas con ADP existe un incremento en la lipoperoxidación que es estadísticamente significativo ($p < 0.0001$ por prueba de Mann Whitney) cuando se compara con los niveles de lipoperoxidación de plaquetas en reposo del mismo grupo (Figura 13).

Por otra parte, los niveles de lipoperoxidación que presentan las plaquetas activadas no fueron diferentes entre los dos grupos de trabajadores (Figura 13).

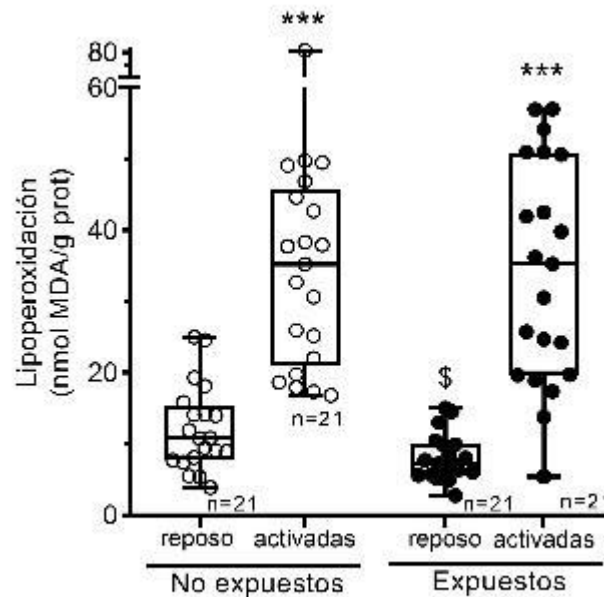


Figura 13. Boxplot de la lipoperoxidación en plaquetas activadas y en reposo de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo. $n=21$ para cada grupo de trabajadores en ambas condiciones. *** $p < 0.001$ con respecto a plaquetas en reposo; \$ $p < 0.05$ comparado con plaquetas en reposo de trabajadores no expuestos obtenidas por Prueba de Mann-Whitney

7.3.2.3 Liberación de anión superóxido

El anión superóxido es la especie reactiva de oxígeno que participa en la mayor cantidad de procesos relacionados con la regulación del sistema de respuesta antioxidante plaquetario, especialmente frente a estímulos o moléculas que activan a las plaquetas. Por ello, los niveles de liberación de anión superóxido fueron determinados también en plaquetas de trabajadores de ambos grupos.

7.3.2.3.1 Liberación de anión superóxido por plaquetas en reposo

En las plaquetas en reposo no hay diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de anión superóxido liberado por las plaquetas de ambos grupos de trabajadores en estudio (Figura 14).

7.3.2.3.2 Liberación de anión superóxido por plaquetas activadas

No obstante, al realizar la cuantificación del anión superóxido liberado por plaquetas activadas se encontró que mientras en las plaquetas de los trabajadores no expuestos se incrementa significativamente, en las plaquetas de los trabajadores expuestos no se estimula la liberación de anión superóxido, y las plaquetas activadas liberan cantidades similares de anión superóxido que las plaquetas en reposo (Figura 14). Este resultado podría estar relacionado con los bajos porcentajes de agregación plaquetaria en los trabajadores expuestos, pues la liberación de anión superóxido es un mecanismo clave para neutralizar a los inhibidores de la agregación.

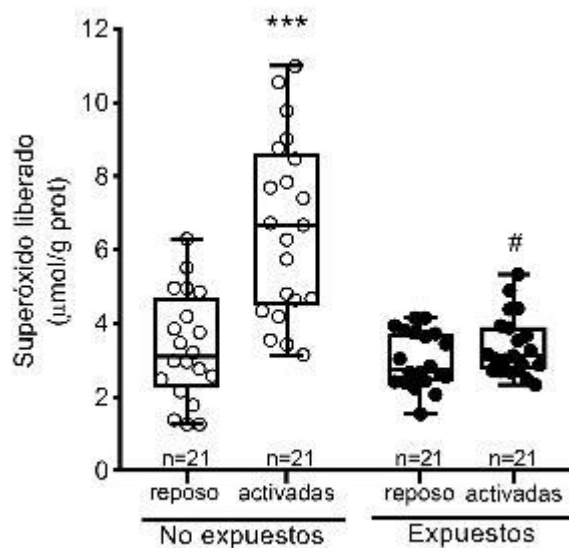


Figura 14. Boxplot de la liberación de superóxido por plaquetas activadas y en reposo de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo. n=21 para cada grupo de trabajadores en ambas condiciones. ***p<0.001 con respecto a plaquetas en reposo; # p<0.001 comparado con plaquetas activadas de trabajadores no expuestos obtenidas por Prueba de Mann-Whitney

7.3.2.4 Concentración de peróxido de hidrógeno

7.3.2.4.1 Concentración de peróxido de hidrógeno en plaquetas en reposo

Para el caso de las plaquetas en reposo, las determinaciones muestran que no hay diferencia significativa entre la concentración de peróxido de hidrógeno de plaquetas de trabajadores expuestos y no expuestos (Figura 15).

7.3.2.4.2 Concentración de peróxido de hidrógeno en plaquetas activadas

Aun cuando en plaquetas en reposo de ambos grupos no existen cambios significativos en la concentración de peróxido de hidrógeno, en plaquetas activadas se encontró que las plaquetas de trabajadores expuestos a plomo tienen mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno que las de trabajadores no expuestos al metal (Figura 15), un comportamiento contrario al observado para el anión superóxido. En la figura 15 se muestra la distribución de la concentración de

peróxido de hidrógeno en ambos grupos, y se observa que las plaquetas activadas de la mitad de los trabajadores expuestos a plomo participantes en el estudio tienen mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno que las plaquetas activadas del total de trabajadores no expuestos.

Al analizar las diferencias entre plaquetas en reposo y plaquetas activadas, se encontró que además las plaquetas activadas contienen más peróxido de hidrógeno que las plaquetas en reposo del mismo grupo ($p < 0.0001$ por prueba de Mann-Whitney para trabajadores expuestos y no expuestos).

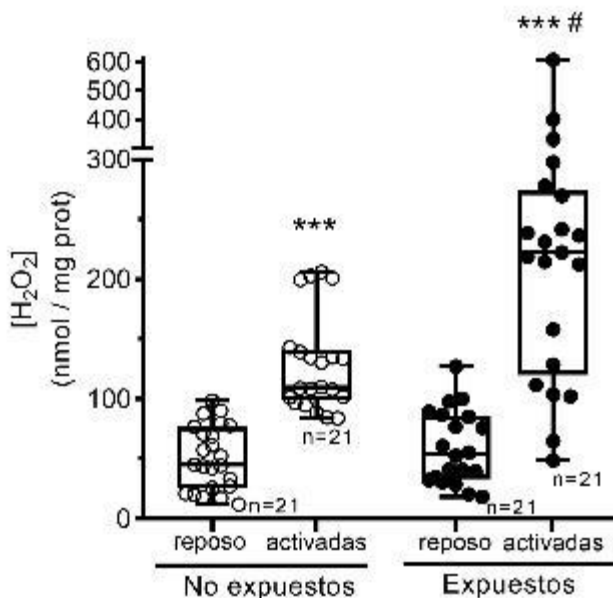


Figura 15. Boxplot de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en plaquetas activadas y en reposo de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo. $n=21$ para cada grupo de trabajadores en ambas condiciones. *** $p < 0.001$ con respecto a plaquetas en reposo; # $p < 0.001$ comparado con plaquetas activadas de trabajadores no expuestos obtenidas por Prueba de Mann-Whitney

7.3.2.5 Concentración de NADPH

7.3.2.5.1 Concentración de NADPH en plaquetas en reposo

En plaquetas en reposo no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de NADPH en plaquetas de trabajadores expuestos y no expuestos (Figura 16).

7.3.2.5.2 Concentración de NADPH en plaquetas activadas

Por otra parte, se encontró que la concentración de NADPH en las plaquetas de los trabajadores de ambos grupos es significativamente menor cuando éstas son activadas con ADP, y las plaquetas de trabajadores expuestos contienen cantidades significativamente menores de NADPH que las plaquetas activadas de trabajadores no expuestos (Figura 16), en general, las plaquetas activadas del 50% de los trabajadores expuestos tienen menores concentraciones de NADPH que las plaquetas de todos los trabajadores no expuestos (Figura 16).

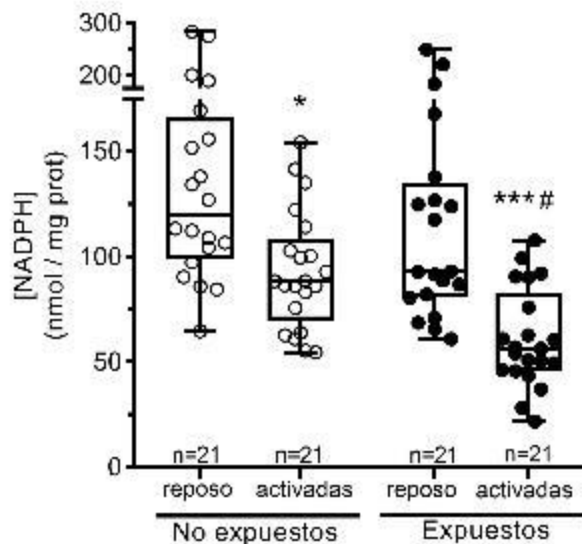


Figura 16. Boxplot de la concentración de NADPH en plaquetas activadas y en reposo de trabajadores expuestos y no expuestos a plomo. n=21 para cada grupo de trabajadores en ambas condiciones. *p<0.05, ***p<0.001 con respecto a plaquetas en reposo; # p<0.001 comparado con plaquetas activadas de trabajadores no expuestos obtenidas por Prueba de Mann-Whitney

7.4 Eriptosis en muestras incubadas con plasma de trabajadores intoxicados

Se exploró la posibilidad de que un factor secretado por plaquetas participe estimulando la muerte celular de eritrocitos que previamente ha sido reportada en trabajadores expuestos a plomo [17]. Este factor o molécula podría provenir de las plaquetas, y al ser secreta por ellas, encontrarse en el plasma de los trabajadores expuestos a plomo. Para investigar esta posibilidad, se diseñó una estrategia metodológica que incluye incubaciones de eritrocitos de voluntarios clínicamente sanos con plasma de trabajadores expuestos.

Tras incubar a los eritrocitos con plasma de trabajadores expuestos y no expuestos y determinar la externalización de fosfatidilserina como marcador de células en eriptosis se encontró que los eritrocitos que fueron incubados en plasma de los trabajadores expuestos a plomo tienen un porcentaje significativamente mayor de eriptosis que los incubados en plasma de trabajadores no expuestos (Figura 17), lo que propone la presencia de una molécula o moléculas en el plasma de trabajadores expuestos a plomo que favorece la eriptosis.

Buscando definir si la PGE₂ pudiera ser la molécula responsable del efecto aquí observado que tiene el plasma de trabajadores intoxicados sobre la muerte celular programada eritrocitaria, se realizaron experimentos *in vivo* e *in vitro*, cuyos resultados se describen a continuación.

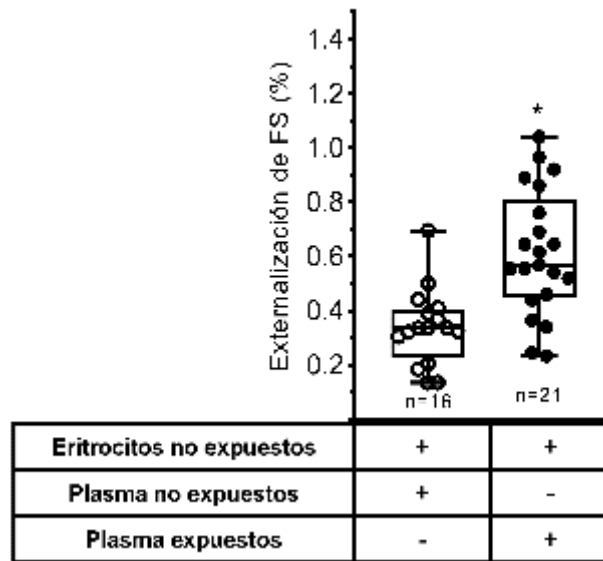


Figura 17. Boxplot de la externalización de fosfatidilserina (FS) en eritrocitos de donadores no expuestos incubados con plasma de trabajadores expuestos a plomo. Eritrocitos de donadores clínicamente sanos fueron incubados durante 24 h con plasma de trabajadores no expuestos, o plasma de trabajadores expuestos a plomo. n=21 y n=16 para muestras incubadas con plasma de trabajadores expuestos y no expuestos, respectivamente. *Diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$ por Mann-Whitney.

7.5 Concentración de PGE₂ en plasma de trabajadores intoxicados

En un experimento *in vivo*, se determinó la concentración de PGE₂ en el plasma de los trabajadores expuestos a plomo y se encontró como resultado que a pesar de la gran dispersión en los datos, el plasma de los trabajadores expuestos a plomo tiene una mayor concentración de PGE₂ que el plasma de los trabajadores no expuestos, y en el gráfico es posible observar que más del 50% de los trabajadores expuestos tiene más PGE₂ en plasma que la totalidad de los trabajadores no expuestos (Figura 18).

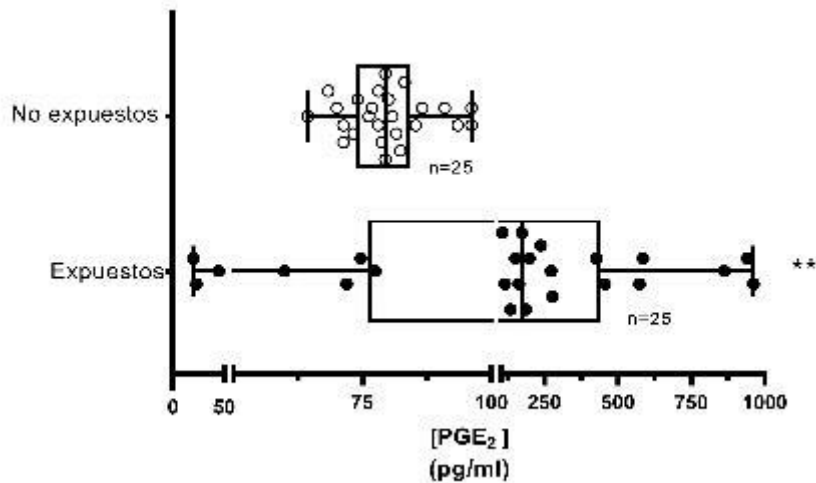


Figura 18. Boxplot de la concentración de prostaglandina E₂ (PGE₂) en plasma de trabajadores intoxicados. n=25 para cada grupo de trabajadores. ** Diferencia estadísticamente significativa p<0.01 obtenida por prueba de Mann Whitney.

7.6 Eriptosis en eritrocitos de donadores clínicamente sanos incubados con plaquetas en presencia de plomo.

En el sentido de identificar el origen de la molécula responsable del efecto del plasma de trabajadores sobre la eriptosis, se realizaron experimentos *in vitro*, en los que se incubaron eritrocitos de donadores clínicamente sanos con plaquetas en presencia de plomo, para analizar si la presencia de plaquetas en condiciones de exposición a plomo favorece la eriptosis.

Se utilizaron en las incubaciones las tres concentraciones de plomo que fueron usadas en experimentos previos: 0.4 μM que corresponde a una concentración de plomo en sangre de una persona con intoxicación leve, 4 μM que es equivalente a una concentración de plomo en sangre de una persona con intoxicación severa, que ha sido encontrada en trabajadores que participan en el estudio, y 40 μM , una concentración alta para observar si se presenta un mayor efecto sobre las plaquetas, además, el uso de esta última concentración permite conservar progresión geométrica en las concentraciones experimentales (razón=10).

Bajo estas condiciones experimentales se encontró que solamente los eritrocitos incubados con plaquetas y la concentración más alta de plomo utilizada (40µM) tuvieron un incremento significativo en el porcentaje de eriptosis (Figura 19), por lo que se decidió utilizar esa concentración de plomo para los experimentos posteriores.

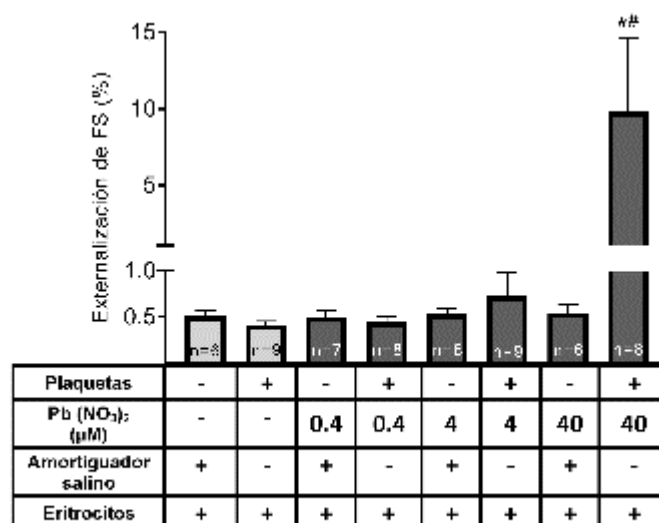


Figura 19. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos incubados con plomo en presencia de plaquetas. Eritrocitos de donadores clínicamente sanos fueron incubados con Pb(NO₃)₂ (0.4, 4 y 40 µM) en presencia o ausencia de plaquetas (PRP), durante 2 h a 37 °C y posteriormente 24 h a 4 °C. Se presenta la media ± EE. n=6 para eritrocitos control y eritrocitos incubados con 40 µM de Pb(NO₃)₂; n=7 para eritrocitos incubados con 0.4 µM de Pb(NO₃)₂; n=8 para eritrocitos incubados con plaquetas y 0.4 µM de Pb(NO₃)₂, para eritrocitos incubados con 4 µM de Pb(NO₃)₂ y para eritrocitos incubados con plaquetas y 40 µM de Pb(NO₃)₂; n=9 para eritrocitos incubados sólo con plaquetas y para eritrocitos incubados con plaquetas y 4 µM de Pb(NO₃)₂ *Diferencia significativa con respecto a incubación sin plaquetas, p<0.05. # Diferencia significativa con respecto a todas las condiciones evaluadas, p<0.05 obtenidas por prueba de Kruskal-Wallis.

7.7 Eriptosis en eritrocitos incubados con sobrenadantes de plaquetas

Para corroborar que las plaquetas son capaces de liberar una molécula que estimula la eriptosis observada en el resultado mostrado en el inciso anterior, se elaboró un diseño experimental utilizando sobrenadantes de plaquetas en reposo y también de plaquetas activadas con ADP, esto último con la finalidad de observar si se trata de una molécula que es preferentemente liberada tras la activación plaquetaria. Los experimentos y resultados descritos en este apartado fueron obtenidos en un sistema libre de plomo.

Inicialmente se determinó un tiempo de 3 h de incubación para los eritrocitos con base en un curso temporal realizado para este fin (Figura 20). El tiempo de incubación más largo ensayado fue de 3 h para mantener la viabilidad de las células.

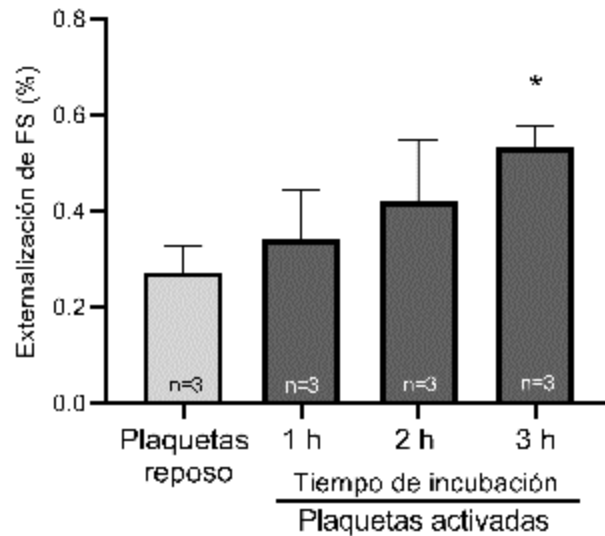


Figura 20. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos incubados con sobrenadantes de plaquetas. Eritrocitos de donadores clínicamente sanos fueron incubados con sobrenadantes de plaquetas, a diferentes tiempos, a 37 °C. Se presentan la media \pm EE. n=3 * Diferencia significativa vs plaquetas en reposo $p < 0.05$ obtenida por prueba de Friedman.

Los experimentos realizados muestran que los eritrocitos incubados con sobrenadantes de plaquetas activadas tienen un mayor porcentaje de externalización de fosfatidilserina que los incubados en sobrenadantes de plaquetas en reposo (Figura 21), lo que indica que moléculas liberadas por la activación plaquetaria estarían implicadas en el proceso de eriptosis.

Para definir si el efecto observado sobre la eriptosis se relaciona con la presencia de PGE_2 en los sobrenadantes plaquetarios, se realizaron experimentos utilizando ácido acetilsalicílico, un inhibidor de la enzima ciclooxigenasa (COX), a una concentración (1mM) capaz de inhibir por completo la agregación plaquetaria *in vitro* y que se ha propuesto como efectiva para evitar de manera irreversible la formación de los productos de la COX [35, 84, 85]. La enzima COX es una enzima clave en la vía de síntesis de la PGE_2 , por lo que su inhibición en plaquetas resulta en la incapacidad de éstas de producir y liberar PGE_2 aun después de ser activadas, se

encontró que las plaquetas tratadas con ácido acetilsalicílico no son capaces de estimular la eriptosis en eritrocitos de individuos clínicamente sanos (Figura 21), lo que sugiere que la PGE₂ proveniente de las plaquetas participa en el proceso de eriptosis.

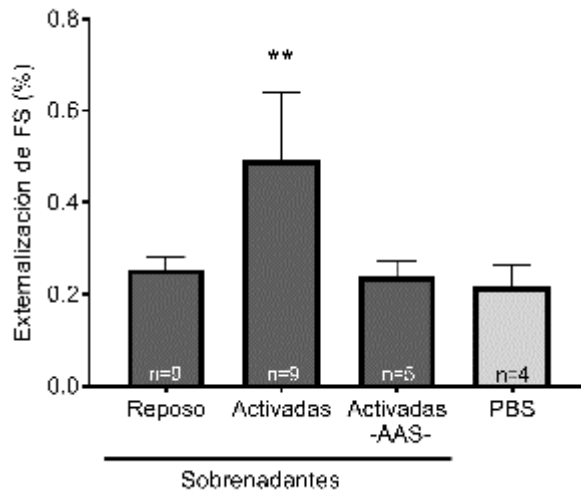


Figura 21. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos incubados con sobrenadantes de plaquetas preincubadas con AAS. Plaquetas de donadores clínicamente sanos se incubaron con ácido acetilsalicílico (AAS, 1 mM, 30 min/37°C), y se recuperó el sobrenadante después de retirar el AAS y activar (ADP 10 µM) o no las plaquetas según se indica. Eritrocitos de donadores clínicamente sanos fueron incubados en los sobrenadantes recuperados durante 3 h /37 °C. Se presenta la media ± EE. n=4 para eritrocitos control; n=5 para eritrocitos incubados con sobrenadantes de plaquetas preincubadas con AAS y n=9 para eritrocitos incubados con sobrenadantes de plaquetas en reposo y activadas. **Diferencia significativa con respecto al efecto de sobrenadantes de plaquetas en reposo y sobrenadantes de plaquetas preincubadas con AAS. p <0.01 obtenida por prueba de Kruskal-Wallis

A continuación se procedió a analizar el nivel de eriptosis cuando las plaquetas involucradas en el proceso fueron expuestas a plomo.

7.8 Eriptosis en eritrocitos incubados con sobrenadantes de plaquetas expuestas a plomo

El diseño experimental utilizado en esta sección se describe a detalle en el apartado 6.14. Los resultados muestran que cuando los experimentos se realizaron utilizando plaquetas que fueron incubadas con plomo antes de la activación con ADP 10µM el efecto de los sobrenadantes sobre el porcentaje de eriptosis es mayor (Figura 22), con independencia de si las plaquetas estaban en reposo o activadas. La diferencia

en estos niveles de eriptosis comparados con los estimulados por plaquetas que no tuvieron contacto con plomo fue estadísticamente significativa, y sugiere que el plomo al que las plaquetas estuvieron expuestas genera alteraciones en el sistema intraplaquetario relacionadas con algún mecanismo que facilita que cuando los sobrenadantes de estas plaquetas tienen contacto con eritrocitos de donadores clínicamente sanos estimulen en mayor medida el proceso de eriptosis.

Para explorar si de manera similar a lo que ocurre en el sistema libre de plomo la vía de producción de PGE₂ (vía del metabolismo del ácido araquidónico) participa en el efecto mediado por los sobrenadantes de plaquetas incubadas con plomo, se incubaron las plaquetas durante 30 min con ácido acetilsalicílico antes de exponerlas a plomo, en buscar de inhibir la actividad de la enzima ciclooxigenasa, y con ello la producción, entre otras moléculas, de la PGE₂.

Tras el análisis de los resultados se encontró que los sobrenadantes de plaquetas en las que se inhibe la vía de producción de PGE₂ antes de exponerlas a plomo producen porcentajes significativamente menores de eriptosis que los sobrenadantes de plaquetas que mantienen íntegra esta vía y se incuban con plomo (Figura 22). Este efecto es más evidente en las plaquetas activadas con ADP, que son las células en las que se espera esta vía tenga una mayor actividad. Aunque inhibir la vía de producción de PGE₂ en las plaquetas no evita por completo el efecto de sus sobrenadantes sobre la eriptosis, los resultados descritos en este apartado soportarían la hipótesis de que la eriptosis desencadenada por intoxicación por plomo está al menos parcialmente influenciada por interacciones entre eritrocitos y plaquetas, probablemente mediadas por la liberación de PGE₂.

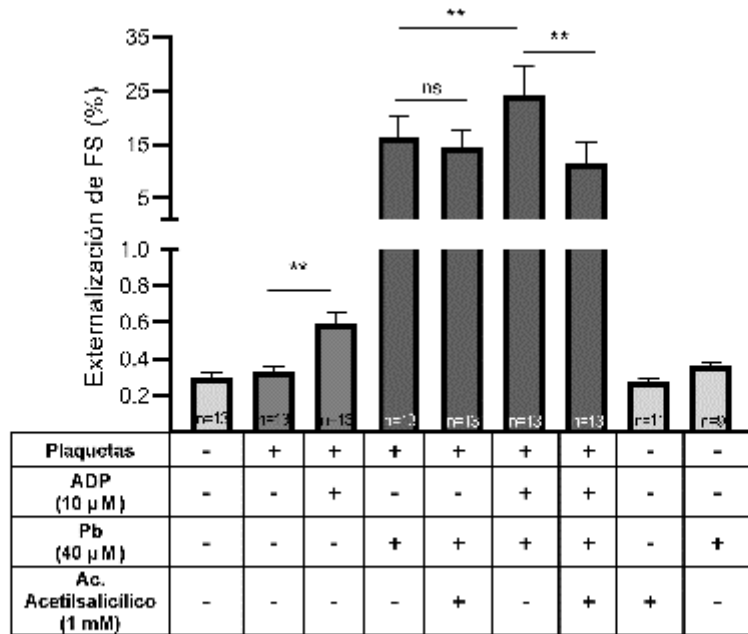


Figura 22. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos incubados con sobrenadantes de plaquetas preincubadas con plomo y/o ácido acetilsalicílico. Plaquetas de donadores clínicamente sanos se incubaron con ácido acetilsalicílico (1mM/30 min/ 37 °C) y/o con plomo (40 μM, 2h/37°C) y se recuperó el sobrenadante después de activar (ADP 10 μM) o no las plaquetas. Eritrocitos de donadores clínicamente sanos fueron incubados en los sobrenadantes recuperados durante 3 h /37 °C. Se presenta la media ± EE. n=9 para eritrocitos incubados sólo con 40 μM de plomo; n= 11 para eritrocitos incubados sólo con ac. Acetilsalicílico y n=13 para el resto de las condiciones presentadas. ** Diferencia significativa con respecto a las condiciones sin plomo ($p < 0.01$) obtenida por prueba de Friedman.

8. DISCUSIÓN

Las plaquetas son células sanguíneas multifuncionales. La función más estudiada es su participación en la hemostasia; otras funciones están relacionadas con su capacidad inmune-inflamatoria mediante la liberación de factores de crecimiento, interleucinas y prostaglandinas, y la activación de integrinas y glicoproteínas membranales. Las plaquetas tienen interacción y modulan la actividad de células del sistema inmune, endoteliales y tumorales [53, 55, 86-93], por lo que se consideran importantes en condiciones que involucran la generación de estados pro-inflamatorios crónicos en pacientes [94-101]. La intoxicación por plomo es una condición con fisiopatología prooxidativa y proinflamatoria que ha sido estudiada en eritrocitos [17, 65, 66, 102] y en leucocitos [103-106], también se han realizado algunos análisis sobre variaciones en parámetros denominados índices plaquetarios [107-111], pero no estudios a nivel intraplaquetario ni de interacciones entre células sanguíneas. En este proyecto se estudió el estado del sistema antioxidante plaquetario en respuesta a exposición a plomo y cómo podría impactar en procesos fisiopatológicos de otros tipos de células, específicamente en la muerte celular programada eritrocitaria, un fenómeno previamente caracterizado en pacientes intoxicados por plomo [17].

El conteo plaquetario de trabajadores expuestos a plomo se encontró en el rango considerado normal para adultos sin enfermedades relacionadas con plaquetas [82] y no tuvo correlación con la concentración de plomo en sangre de los trabajadores; un resultado similar al reportado por Kianoush 2013, Dobradowsky 2016 y Chwalva en 2018 [108-110], quienes no encontraron correlación entre el nivel de plomo en sangre y los conteos plaquetarios en trabajadores expuestos a plomo ($r=0.05$, $p=0.29$ en nuestro estudio). Ya que el número de plaquetas no refleja la función plaquetaria, que los trabajadores expuestos a plomo tengan conteos plaquetarios dentro de los rangos de referencia no descarta la posibilidad de funciones anómalas en las plaquetas.

Una de las pruebas más utilizadas para analizar la función de las plaquetas es la determinación de la agregación plaquetaria. En este trabajo realizamos aproximaciones *in vitro* incubando plasma rico en plaquetas (PRP) con diferentes concentraciones de plomo a diferentes tiempos, y analizamos la agregación plaquetaria por agregometría óptica y por impedancia. Ninguna de las condiciones experimentales tuvo efectos significativos sobre la agregación plaquetaria. Trabajos análogos en los que se incubaron plaquetas con plomo son el presentado por Nesaratnam et al., en una carta al editor de la revista *Thrombosis and Haemostasis* en 1992 [112], en la que se presentan experimentos incubando plaquetas humanas lavadas (a diferencia del presente trabajo en el que se utilizó PRP) con plomo a concentraciones entre 1-5 μM sin encontrar efecto sobre la agregación plaquetaria; por otro lado, López et al.[113]; reportaron un 50% de inhibición de la agregación plaquetaria utilizando PRP humano al que se añadieron concentraciones de plomo en el rango 15-17.5 mM, un orden de magnitud por arriba de las utilizadas en este trabajo.

Por otra parte, en las plaquetas obtenidas de trabajadores expuestos y estimuladas con ADP 10 μM (experimentos *in vivo*) se encontró que agregan un 30% menos que las plaquetas de trabajadores no expuestos a plomo, y una correlación negativa entre la concentración de plomo en sangre de los trabajadores y el porcentaje de agregación plaquetaria ($r^2=0.44$, $p<0.001$), que podría, sin embargo, estar influida por la heterogeneidad entre los grupos de trabajadores. Resultados similares fueron reportados por Sharp et al., [114] que encontró una débil, aunque significativa correlación entre el plomo en sangre de pacientes masculinos y una menor agregación plaquetaria ($r^2=0.012$) en respuesta a ADP. Aunque en este trabajo en los resultados de los experimentos con plomo *in vitro* no se encontraron afectaciones a la agregación plaquetaria, sí observamos una menor agregación en las plaquetas de trabajadores expuestos que tienen altas concentraciones de plomo en sangre (exposición crónica), lo que pone en evidencia que aunque las aproximaciones *in vitro* son útiles para entender una variedad de fenómenos y en ocasiones aportan ventajas experimentales, no son siempre el mejor reflejo del

comportamiento de la agregación plaquetaria en el organismo, especialmente cuando se involucran efectos a largo plazo o crónicos, que podrían relacionarse con el desarrollo de procesos adaptativos como se mostró en un reporte con plaquetas en condiciones de exposición a vanadio, en el que los autores observaron más del 50% de inhibición de la agregación plaquetaria en experimentos *in vitro* con incubaciones de hasta 30 minutos; sin embargo, aunque la inhibición de la agregación se observó en ratas expuestas durante 4 semanas, el efecto se pierde a largo plazo (8 semanas de exposición), lo que podría implicar un proceso adaptativo que no puede ocurrir en el modelo *in vitro* [115].

Los trabajadores expuestos tienen menor agregación plaquetaria pero no presentan manifestaciones clínicas relacionadas con problemas hemostáticos que se esperaría encontrar en pacientes con bajos porcentajes de agregación; lo que podría relacionarse con el desarrollo de mecanismos compensatorios para mantener la hemostasia en el organismo de los trabajadores expuestos.

Ya que la función plaquetaria está fuertemente relacionada con la regulación (plaquetas en reposo) y la producción de ROS (en plaquetas activadas), analizamos el estatus antioxidante de las plaquetas de los trabajadores para saber si cambios en el sistema oxidante/antioxidante participan en el efecto de la exposición a plomo sobre la función plaquetaria, como ha sido observado en leucocitos, hepatocitos, eritrocitos y espermatozoides [11, 16, 59, 61, 64, 67].

Los experimentos *in vitro* incubando plaquetas de donadores clínicamente sanos con plomo muestran que a una hora de incubación, aun en reposo, las plaquetas liberan más superóxido al medio (5.69, 5.69 y 5.8 nmol/mg de prot para plaquetas incubadas con 0.4, 4 y 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, respectivamente), incluso a niveles mayores a los reportados por Wachowicz y Olas, (2003) (3 y 2.5 nmol/mg de prot, respectivamente) para plaquetas activadas con trombina [79]. Por otra parte, las plaquetas no manifiestan cambios en la lipoperoxidación ni en la actividad de la catalasa después de ser incubadas con plomo, a diferencia de lo reportado en osteoblastos, eritrocitos, células beta pancreáticas y linfocitos, que al ser incubados con plomo incrementan sus niveles de lipoperoxidación [64, 67, 116-118]; las

diferencias entre los resultados de este trabajo y los anteriormente mencionados sugerirían que la mayor producción de superóxido por las plaquetas no se relaciona directamente con la generación de estrés oxidativo y podría ser el reflejo de la respuesta celular específica, además, el tiempo de incubación utilizado también es un factor a considerar, ya que en las otras células (osteoblastos, eritrocitos, células beta pancreáticas y linfocitos) se reportaron daños al sistema antioxidante utilizando incubaciones con plomo durante 24, 48 y hasta 120 h [67, 116-118], tiempos que no es posible ensayar en plaquetas por el compromiso con la viabilidad celular.

Respecto al estatus antioxidante de plaquetas de trabajadores crónicamente expuestos (experimentos *in vivo*), se observan características particulares con diferencias entre las plaquetas en reposo y las plaquetas activadas con ADP. En las plaquetas en reposo encontramos bajos niveles de lipoperoxidación y baja actividad de catalasa en comparación con plaquetas de trabajadores no expuestos. Los niveles de lipoperoxidación encontrados podrían deberse al reflejo de altas tasas de recambio plaquetario que no se midió en este estudio y que podría determinarse mediante el conteo de plaquetas reticuladas, lo que respaldaría la propuesta de una respuesta adaptativa para mantener la estabilidad membranal plaquetaria y evitar la activación que podría ser estimulada por el ambiente pro-oxidativo provocado por la exposición a plomo en la circulación sanguínea, como ocurre en pacientes con diabetes y enfermedades cardiovasculares [119-127]. Por otra parte, bajos niveles de actividad de catalasa en células sanguíneas han sido asociados con altos niveles de homocisteína en plasma [128, 129], una condición que se manifiesta en personas con niveles elevados de plomo en sangre [130]; los niveles de expresión de la enzima catalasa (no explorados en este proyecto) podrían también estar implicados, de forma análoga a lo observado en plaquetas en reposo de pacientes con diabetes [131], una condición patológica que al igual que la intoxicación por plomo, promueve un ambiente de tipo pro-oxidativo y pro-inflamatorio.

Tanto la lipoperoxidación como la actividad de catalasa se incrementaron al activar a las plaquetas con ADP, posiblemente como respuesta a la producción de ROS al interior de las plaquetas [47, 132]. Además, se detectó que las plaquetas activadas

de trabajadores expuestos no incrementan la liberación de anión superóxido, tienen una mayor concentración de peróxido de hidrógeno y una menor concentración de NADPH que plaquetas de trabajadores no expuestos. La activación plaquetaria estimula la producción de ROS mayoritariamente a través del complejo enzimático NOX como un mecanismo para favorecer la agregación plaquetaria y la formación del trombo [133], por lo que en condiciones no patológicas la liberación de anión superóxido se incrementa al activarse la plaqueta; lo que ocurrió solo en las plaquetas de trabajadores no expuestos, mientras que las plaquetas de trabajadores expuestos no incrementaron la liberación de este radical libre, probablemente por la menor disponibilidad de NADPH como sustrato de NOX, lo que podría actuar como mecanismo compensatorio o deberse a una menor restitución de la molécula por un efecto tóxico de la exposición a plomo sobre el metabolismo de carbohidratos [134]; aunque la disponibilidad de superóxido también se relaciona con la actividad de la SOD, que utiliza este radical como sustrato.

En las plaquetas se expresan dos isoformas de la SOD que convierten anión superóxido a peróxido de hidrógeno y se ha demostrado que solo la isoforma citosólica (SOD1) es indispensable para regular la actividad plaquetaria relacionada con las ROS, mientras que la SOD2 tiene un papel local dentro de la mitocondria [135, 136]. En condiciones fisiológicas la actividad de la SOD1 participa en la formación y resolución del trombo [132] pero una sobreactivación de vías de señalización intracelular que se saben sobrerreguladas por plomo en células de trabajadores expuestos [137, 138] podría incrementar la actividad de esta enzima en las plaquetas, como ocurre en eritrocitos de trabajadores expuestos [9, 139], lo que explicaría que las plaquetas activadas de los trabajadores tengan una mayor concentración de peróxido de hidrógeno, desencadenando una mayor actividad de catalasa.

Por otra parte, ya que la liberación de superóxido es un mecanismo que favorece la agregación plaquetaria [140-142], su disminución estaría relacionada con los bajos porcentajes de agregación encontrados en los trabajadores expuestos.

Además de las ROS, otras moléculas participan en la regulación e inhibición de la agregación plaquetaria; entre ellas la PGE₂ [143-147]. En este trabajo encontramos que los trabajadores expuestos a plomo tienen concentraciones significativamente elevadas de PGE₂ en plasma, a niveles que se ha reportado podrían regular negativamente la agregación por dos mecanismos principales: desencadenando señalización intracelular a través del receptor EP4 para incrementar la concentración de cAMP, inhibidor de la agregación, dentro de las plaquetas [143, 148, 149]; y a través de la inhibición de la actividad de NOX, disminuyendo la producción de superóxido, como se ha visto en neutrófilos activados [150].

Adicionalmente la PGE₂ puede alterar procesos de otras células circulantes, como los eritrocitos, en los que se ha documentado la participación de la PGE₂ como desencadenante de eriptosis [20, 151].

Anteriormente se planteó en este trabajo la probabilidad de una molécula liberada por plaquetas de trabajadores expuestos participando en el incremento de la eriptosis que se ha encontrado en trabajadores expuestos a plomo y que podría ser la PGE₂ [17]. Nuestros resultados muestran que el plasma de los trabajadores expuestos que tiene altas concentraciones de PGE₂ estimula la eriptosis en eritrocitos de donadores clínicamente sanos. El mismo fenómeno podría tener lugar en el organismo de los trabajadores expuestos, en los que la PGE₂, de probable origen mayormente plaquetario, mediaría el incremento en la eriptosis. Sin embargo, no existen, en nuestro conocimiento, reportes que establezcan la relación entre la eriptosis y las plaquetas en pacientes ni en aproximaciones *in vitro*.

En ese sentido, en experimentos *in vitro* para explorar la participación plaquetaria en el proceso de eriptosis, encontramos que las plaquetas de donadores clínicamente sanos que fueron incubadas con una alta concentración de plomo antes de ser activadas, liberan una molécula o moléculas que incrementan la eriptosis en eritrocitos de donadores clínicamente sanos. Los resultados de estos experimentos también sugirieron la participación de la enzima ciclooxigenasa plaquetaria, que participa en la vía del metabolismo del ácido araquidónico, lo que sustenta el planteamiento de que en condiciones de intoxicación por plomo, la

eriptosis está influenciada por las plaquetas, al menos parcialmente, a través de la liberación de moléculas como el tromboxano A₂, la PGD₂, la PGF₂, la PGI₂ o la PGE₂, siendo esta última la única con reportes de participación en el proceso eriptótico y que se encontró en concentraciones elevadas en el plasma de trabajadores expuestos.

Los sobrenadantes de plaquetas activadas no incubadas con plomo también estimularon la eriptosis (aunque en menor proporción que las plaquetas incubadas con plomo), a través de una molécula producida por la vía del metabolismo del ácido araquidónico, probablemente la PGE₂. Ya que las plaquetas activadas son las células que generan PGE₂ en mayor cantidad, estos resultados apoyarían que la hipótesis planteada por Lang (2005) [20] acerca de la participación de la PGE₂ plaquetaria en la eriptosis ocurre fisiológicamente en individuos clínicamente sanos, en los que la producción y liberación de PGE₂ por parte de las plaquetas activadas podría constituir un mecanismo colaborativo para la eliminación no patológica de remanes de coágulos en los que se incluyen tanto eritrocitos como leucocitos y plaquetas.

Los resultados obtenidos con plaquetas incubadas con plomo se observaron especialmente con plaquetas activadas. Una elevada producción de PGE₂ que permita alcanzar los niveles observados en el plasma de los trabajadores expuestos requeriría, para el caso de las plaquetas, de un incremento en la degranulación, que podría estar favorecido por el contexto pro-oxidativo y pro-inflamatorio en la sangre de los trabajadores, caracterizado por baja actividad de δ -ALAD y enzimas antioxidantes, bajos niveles de grupos tiol, niveles incrementados de lipoperoxidación, niveles elevados de proteína C reactiva e interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α) conteos elevados de glóbulos blancos y bajos niveles de anticuerpos (IgG and IgM) y moléculas del complemento (C3 and C4) [102, 105, 139, 152-159]. En pacientes con otras patologías se ha demostrado que ambientes pro-oxidativos y pro-inflamatorios estimulan incrementos en la activación, la degranulación y la agregación plaquetarias [119, 120, 122-124, 126, 127] que favorecen la generación de problemas trombóticos que no se manifiestan en los

trabajadores expuestos a plomo. Podría entonces proponerse que los trabajadores expuestos manifiestan las condiciones para estimular una mayor activación y degranulación plaquetaria (haciendo posible así una mayor producción y liberación de PGE₂), que no resultan en problemas trombóticos gracias al desarrollo de un mecanismo adaptativo para disminuir la agregación en el que se involucran las alteraciones en la respuesta redox intracelular, una probable interacción directa del plomo con las integrinas de la membrana plaquetaria [160, 161]; la actividad antiagregante de la MMP-9, que se ha encontrado correlaciona positivamente con la concentración de plomo en sangre de individuos expuestos [162, 163], y la acción antiagregante, por los mecanismos antes mencionados, de las altas concentraciones de PGE₂. Ese mecanismo adaptativo resultaría, por una parte, funcional para evitar eventos trombóticos en los trabajadores, pero el incremento en la disponibilidad de PGE₂ implicado, generaría por otra parte, un ambiente pro-eriptótico en estos pacientes.

Es necesario considerar que además de la PGE₂, las plaquetas al activarse liberan otras moléculas entre las que se encuentra el factor activador plaquetario (PAF), una molécula proinflamatoria que también puede participar en el incremento de la eriptosis al estimular la producción de ceramidas por una esfingomielinasa [164] y la actividad de la escramblasa de fosfatidilserina. Aunque los eritrocitos producen PAF al iniciar el proceso eriptótico, también expresan un receptor para PAF a nivel de membrana, que al ser activado produce el mismo efecto sobre la célula. Así mismo, la vía de producción de PGE₂ (que está en concentraciones elevadas en plasma de trabajadores expuestos a plomo) se encuentra altamente relacionada con la vía de producción de PAF, especialmente en células de tipo inflamatorio [165], por lo que la producción de PGE₂ podría implicar también una mayor producción de PAF en los trabajadores expuestos; de hecho, en el año 2019 se reportó que los eritrocitos de trabajadores expuestos a plomo participantes en este proyecto mantienen la vía de producción de ceramidas (que puede activarse por PAF) altamente activa como un mecanismo para favorecer la eriptosis [102], por lo que se puede proponer que ambas moléculas la PGE₂, y el PAF mediarían, en

diferente porcentaje, la interacción entre la plaqueta y el eritrocito, que resulte en la estimulación de la eriptosis en los trabajadores expuestos a plomo.

9. CONCLUSIONES

-Los trabajadores crónicamente expuestos a plomo participantes en el proyecto cumplen con los criterios para ser considerados pacientes con intoxicación por plomo y presentan menor porcentaje de agregación plaquetaria inducida con ADP como agente agonista, en PRP ajustado.

- Las plaquetas responden de manera distinta a los estímulos de agregación cuando están bajo exposición crónica (plaquetas de trabajadores expuestos) que cuando se les incuba con plomo *in vitro*.

-En incubaciones *in vitro*, el plomo incrementa la liberación de anión superóxido por plaquetas tratadas desde concentraciones equivalentes a intoxicación leve en trabajadores.

-Las plaquetas en reposo de los trabajadores expuestos presentan un eficiente sistema de defensa antioxidante, con bajos niveles de lipoperoxidación y ROS en equilibrio.

-Las plaquetas de trabajadores intoxicados por plomo activadas con ADP presentan alteraciones en la respuesta del sistema oxidante/antioxidante, con incrementos en la lipoperoxidación y una deficiente producción y liberación de superóxido, lo que se relacionaría con la menor agregación plaquetaria observada en los trabajadores.

-Una molécula(s) contenida en el plasma de trabajadores intoxicados produce un incremento en la apoptosis de eritrocitos de voluntarios clínicamente sanos.

-Los trabajadores intoxicados por plomo tienen concentraciones elevadas de PGE₂ en plasma, a niveles que podrían inhibir la agregación plaquetaria, además de favorecer la eriptosis.

- Los sobrenadantes de plaquetas activadas favorecen la eriptosis, efecto que se revierte al inhibir la actividad de la enzima ciclooxygenasa.

-Los sobrenadantes de plaquetas incubadas con plomo contienen una molécula(s) que inducen la eriptosis.

-La vía del metabolismo del ácido araquidónico por la enzima ciclooxigenasa en plaquetas participa en la estimulación de la eritosis en condiciones de intoxicación por plomo.

10. PERSPECTIVAS

-Analizar el comportamiento del sistema antioxidante plaquetario en respuesta a otros agentes agonistas: colágena, epinefrina, etc.

-Estudiar la actividad del componente enzimático del sistema antioxidante plaquetario (superóxido dismutasa, peroxirredoxinas, tioredoxinas, etc) en trabajadores expuestos a plomo en plaquetas en reposo y plaquetas activadas.

-Analizar la degranulación plaquetaria en trabajadores expuestos a plomo.

-Analizar los niveles de activación plaquetaria en trabajadores expuestos a plomo.

-Determinar las concentraciones de PAF en plasma de los trabajadores expuestos a plomo.

-Estudiar el papel de PAF de origen plaquetario sobre la eritosis en trabajadores expuestos a plomo.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Jomova, K. and M. Valko, *Advances in metal-induced oxidative stress and human disease*. Toxicology, 2011. **283**(2-3): p. 65-87.
2. Wani, A.L., A. Ara, and J.A. Usmani, *Lead toxicity: a review*. Interdiscip Toxicol, 2015. **8**(2): p. 55-64.
3. Calderon-Salinas, J.V. and M. Maldonado-Vega, *Contaminación e intoxicación por plomo*. Primera Edición ed. 2008, México, D.F.: Trillas.
4. Bhullar, D.S., A.S. Thind, and A. Singla, *Childhood lead poisoning- a review*. J Punjab Acad Forensic Med Toxicol, 2015. **15**: p. 7.
5. Flora, G., D. Gupta, and A. Tiwari, *Toxicity of lead: A review with recent updates*. Interdiscip Toxicol, 2012. **5**(2): p. 47-58.
6. Kalia, K. and S.J. Flora, *Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning*. J Occup Health, 2005. **47**(1): p. 1-21.
7. Gonick, H.C., *Nephrotoxicity of cadmium & lead*. Indian J Med Res, 2008. **128**(4): p. 335-52.
8. Lidsky, T.I. and J.S. Schneider, *Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates*. Brain, 2003. **126**(Pt 1): p. 5-19.
9. Sugawara, E., et al., *Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead*. Br J Ind Med, 1991. **48**(4): p. 239-42.
10. Dresner, D.L., et al., *Modulation of bone marrow heme and protein synthesis by trace elements*. Environ Res, 1982. **28**(1): p. 55-66.
11. Hunaiti, A.A. and M. Soud, *Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood*. Sci Total Environ, 2000. **248**(1): p. 45-50.
12. Rahal, A., et al., *Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 761264.
13. Samoylenko, A., et al., *Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: from mechanisms to biomarkers and clinical evidence*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(17): p. 2157-96.
14. Quintanar-Escorza, M.A. and J.V. Calderón-Salinas, *LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL. BASES Y APLICACIONES* Revista de Educación Bioquímica, 2009. **28**: p. 13.
15. Calderon-Salinas, J.V., et al., *Lead and calcium transport in human erythrocyte*. Hum Exp Toxicol, 1999. **18**(5): p. 327-32.
16. Rendon-Ramirez, A., et al., *Vitamin-E reduces the oxidative damage on delta-aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes*. Toxicol In Vitro, 2007. **21**(6): p. 1121-6.

17. Aguilar-Dorado, I.C., et al., *Eryptosis in lead-exposed workers*. Toxicol Appl Pharmacol, 2014. **281**(2): p. 195-202.
18. Herlax, V., et al., *Eriptosis, la muerte suicida de eritrocitos mecanismo y enfermedades asociadas*. Acta Bioquím Clín Latinoam 2011. **45**: p. 10.
19. Quintanar-Escorza, M.A. and J.V. Calderón-Salinas, *ERIPTOSIS, LA APOPTOSIS DEL ERITROCITO*. Revista de Educación Bioquímica, 2006. **25**.
20. Lang, P.A., et al., *PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death*. Cell Death Differ, 2005. **12**(5): p. 415-28.
21. Wieder, T., et al., *Studying Mechanisms of Eryptosis*. Cytotechnology, 2005. **49**(2-3): p. 117-132.
22. Loynes, C.A., et al., *PGE2 production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution in vivo*. Sci Adv, 2018. **4**(9): p. eaar8320.
23. Nakanishi, M. and D.W. Rosenberg, *Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(2): p. 123-37.
24. Martinez-Colon, G.J. and B.B. Moore, *Prostaglandin E2 as a Regulator of Immunity to Pathogens*. Pharmacol Ther, 2018. **185**: p. 135-146.
25. Huang, S.K., et al., *Prostaglandin E(2) induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival pathways*. FASEB J, 2009. **23**(12): p. 4317-26.
26. Nishimura, K., et al., *Endogenous prostaglandins E2 and F 2alpha serve as an anti-apoptotic factor against apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in mouse 3T3-L1 preadipocytes*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70**(9): p. 2145-53.
27. Porter, B.O. and T.R. Malek, *Prostaglandin E2 inhibits T cell activation-induced apoptosis and Fas-mediated cellular cytotoxicity by blockade of Fas-ligand induction*. Eur J Immunol, 1999. **29**(7): p. 2360-5.
28. Tessner, T.G., et al., *Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation*. J Clin Invest, 2004. **114**(11): p. 1676-85.
29. Kovarova, M. and B.H. Koller, *PGE(2) promotes apoptosis induced by cytokine deprivation through EP3 receptor and induces Bim in mouse mast cells*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e102948.
30. Takadera, T., et al., *Prostaglandin E(2) induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells*. Neurosci Lett, 2002. **317**(2): p. 61-4.
31. Kaestner, L., et al., *Prostaglandin E2 activates channel-mediated calcium entry in human erythrocytes: an indication for a blood clot formation supporting process*. Thromb Haemost, 2004. **92**(6): p. 1269-72.

32. Li, Q., et al., *Prostaglandin E2 stimulates a Ca²⁺-dependent K⁺ channel in human erythrocytes and alters cell volume and filterability.* J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18651-6.
33. Park, J.Y., M.H. Pillinger, and S.B. Abramson, *Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases.* Clin Immunol, 2006. **119**(3): p. 229-40.
34. Foudi, N., et al., *Prostaglandin E2 receptor subtypes in human blood and vascular cells.* Eur J Pharmacol, 2012. **695**(1-3): p. 1-6.
35. Simmons, D.L., R.M. Botting, and T. Hla, *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition.* Pharmacol Rev, 2004. **56**(3): p. 387-437.
36. Sugimoto, Y. and S. Narumiya, *Prostaglandin E receptors.* J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 11613-7.
37. Rivadeneyra, L., et al., *Así comienza la vida plaquetaria, un viaje desde los megacariocitos medulares a las plaquetas circulantes.* Acta Bioquím Clín Latinoam, 2016. **50**: p. 13.
38. Garraud, O. and F. Cognasse, *Are Platelets Cells? And if Yes, are They Immune Cells?* Front Immunol, 2015. **6**: p. 70.
39. Fritsma, G., *Platelet Structure and Function.* Clin Lab Sci, 2015. **28**: p. 7.
40. Michelson, A.D., *How platelets work: platelet function and dysfunction.* J Thromb Thrombolysis, 2003. **16**(1-2): p. 7-12.
41. Mason, K.D., et al., *Programmed anuclear cell death delimits platelet life span.* Cell, 2007. **128**(6): p. 1173-86.
42. Italiano, J.E. and J. Hartwig, *Megakaryocyte Development and Platelet Formation,* in *Platelets,* A. Michelson, Editor. 2013, Academic Press. p. 1400.
43. Leytin, V., *Apoptosis in the anucleate platelet.* Blood Rev, 2012. **26**(2): p. 51-63.
44. Michelson, A.D., *The Clinical Approach to Disorders of Platelet Number and Function,* in *Platelets,* A. Michelson, Editor. 2019, Academic Press. p. 1230.
45. Violi, F. and P. Pignatelli, *Platelet oxidative stress and thrombosis.* Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 378-81.
46. Estevez, B. and X. Du, *New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling.* Physiology (Bethesda), 2017. **32**(2): p. 162-177.
47. Hernández-García, S., F.C. Meneses, and J.V. Calderón-Salinas, *Producción y función de especies reactivas de oxígeno en plaquetas.* Revista de Educación Bioquímica, 2020. **39**: p. 9.
48. Kraemer, B.F., et al., *Novel anti-bacterial activities of beta-defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation.* PLoS Pathog, 2011. **7**(11): p. e1002355.

49. Raiden, S., et al., *Human platelets produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and delay eosinophil apoptosis*. Lab Invest, 2003. **83**(4): p. 589-98.
50. Cognasse, F., et al., *Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins*. Exp Hematol, 2007. **35**(9): p. 1376-87.
51. Alard, J.E., et al., *Recruitment of classical monocytes can be inhibited by disturbing heteromers of neutrophil HNP1 and platelet CCL5*. Sci Transl Med, 2015. **7**(317): p. 317ra196.
52. Ando, Y., T. Oku, and T. Tsuji, *Platelets attenuate production of cytokines and nitric oxide by macrophages in response to bacterial endotoxin*. Platelets, 2016. **27**(4): p. 344-50.
53. Koupenova, M., et al., *Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis*. Circ Res, 2018. **122**(2): p. 337-351.
54. Xiang, B., et al., *Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2657.
55. Linke, B., et al., *Activated Platelets Induce an Anti-Inflammatory Response of Monocytes/Macrophages through Cross-Regulation of PGE2 and Cytokines*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 1463216.
56. Guillem-Llobat, P., et al., *Aspirin prevents colorectal cancer metastasis in mice by splitting the crosstalk between platelets and tumor cells*. Oncotarget, 2016. **7**(22): p. 32462-77.
57. Audesirk, G., *Effects of lead exposure on the physiology of neurons*. Prog Neurobiol, 1985. **24**(3): p. 199-231.
58. Braga, M.F., E.F. Pereira, and E.X. Albuquerque, *Nanomolar concentrations of lead inhibit glutamatergic and GABAergic transmission in hippocampal neurons*. Brain Res, 1999. **826**(1): p. 22-34.
59. El-Magd, M.A., et al., *A potential mechanism associated with lead-induced testicular toxicity in rats*. Andrologia, 2017. **49**(9).
60. Quintanilla-Vega, B., et al., *Prophyrin production and excretion by long-term cultures of adult rat hepatocytes and effect of lead exposure*. Toxicology, 1995. **102**(3): p. 275-83.
61. Mujaibel, L.M. and N. Kilarkaje, *Mitogen-activated protein kinase signaling and its association with oxidative stress and apoptosis in lead-exposed hepatocytes*. Environ Toxicol, 2015. **30**(5): p. 513-29.
62. Milosevic, N. and P. Maier, *Lead stimulates intercellular signalling between hepatocytes and Kupffer cells*. Eur J Pharmacol, 2000. **401**(3): p. 317-28.
63. Trama-Freitas, B., et al., *A study of bio-hybrid silsesquioxane/yeast: Biosorption and neuronal toxicity of lead*. J Biotechnol, 2017. **264**: p. 43-50.

64. Zarei, M.H., et al., *Lead acetate toxicity on human lymphocytes at non-cytotoxic concentrations detected in human blood*. Main Group Metal Chemistry, 2017. **40**(5-6).
65. Calderon-Salinas, J.V., et al., *Effect of lead on the calcium transport in human erythrocyte*. Hum Exp Toxicol, 1999. **18**(3): p. 146-53.
66. Slobozhanina, E.I., et al., *Lead-induced changes in human erythrocytes and lymphocytes*. J Appl Toxicol, 2005. **25**(2): p. 109-14.
67. Quintanar-Escorza, M.A., et al., *Oxidative damage increases intracellular free calcium [Ca²⁺]_i concentration in human erythrocytes incubated with lead*. Toxicol In Vitro, 2010. **24**(5): p. 1338-46.
68. Hsu, P.C. and Y.L. Guo, *Antioxidant nutrients and lead toxicity*. Toxicology, 2002. **180**(1): p. 33-44.
69. Aguilar-Dorado, I.C., *El papel de la PGE2 y el daño oxidativo como inductores en el proceso de eritropoiesis en la intoxicación con plomo*, in *Bioquímica*. 2016, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. p. 105.
70. Oonishi, T., et al., *Production of prostaglandins E1 and E2 by adult human red blood cells*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 1998. **56**(2-3): p. 89-101.
71. Stengel, D. and J. Hanoune, *The catalytic unit of ram sperm adenylate cyclase can be activated through the guanine nucleotide regulatory component and prostaglandin receptors of human erythrocyte*. J Biol Chem, 1981. **256**(11): p. 5394-8.
72. Brightman, C., *Lead poisoning rare but be aware*. Trends in Urology & Men's Health, 2017. **8**(6): p. 3.
73. Abed, M., et al., *Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease*. J Mol Med (Berl), 2014. **92**(8): p. 871-9.
74. Taylor, L., et al., *Evaluation of a portable blood lead analyzer with occupationally exposed populations*. Am J Ind Med, 2001. **40**(4): p. 354-62.
75. Berlin, A. and K.H. Schaller, *European standardized method for the determination of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood*. Z Klin Chem Klin Biochem, 1974. **12**(8): p. 389-90.
76. Burch, H.B. and A.L. Siegel, *Improved method for measurement of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity of human erythrocytes*. Clin Chem, 1971. **17**(10): p. 1038-41.
77. Redig, P.T., et al., *Effects of chronic exposure to sublethal concentrations of lead acetate on heme synthesis and immune function in red-tailed hawks*. Arch Environ Contam Toxicol, 1991. **21**(1): p. 72-7.
78. Jahn, B. and G.M. Hansch, *Oxygen radical generation in human platelets: dependence on 12-lipoxygenase activity and on the glutathione cycle*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1990. **93**(1): p. 73-9.

79. Wachowicz, B., et al., *Generation of reactive oxygen species in blood platelets*. Platelets, 2002. **13**(3): p. 175-82.
80. Pick, E. and Y. Keisari, *Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages--induction by multiple nonphagocytic stimuli*. Cell Immunol, 1981. **59**(2): p. 301-18.
81. Veskoukis, A.S., et al., *Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood and tissues: the NADPH network*. Redox Rep, 2018. **23**(1): p. 47-56.
82. Díaz, P., et al., *Determinación de los intervalos de referencia de biometría hemática en población mexicana*. Rev Latinoamer Patol Clin, 2012. **59**: p. 8.
83. Cattaneo, M., et al., *Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH*. J Thromb Haemost, 2013.
84. Armstrong, P.C., et al., *Aspirin and the in vitro linear relationship between thromboxane A2-mediated platelet aggregation and platelet production of thromboxane A2*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(11): p. 1933-43.
85. Lee, T.K., et al., *Inhibitory effect of acetylsalicylic acid on platelet function in patients with completed stroke or reversible ischemic neurologic deficit*. Stroke, 1988. **19**(5): p. 566-70.
86. Lucotti, S. and R.J. Muschel, *Platelets and Metastasis: New Implications of an Old Interplay*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 1350.
87. Vieira-de-Abreu, A., et al., *Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(1): p. 5-30.
88. Maouia, A., et al., *The Immune Nature of Platelets Revisited*. Transfus Med Rev, 2020. **34**(4): p. 209-220.
89. Karolczak, K. and C. Watala, *Blood Platelets as an Important but Underrated Circulating Source of TGFbeta*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(9).
90. Rolfes, V., et al., *Platelets Fuel the Inflammasome Activation of Innate Immune Cells*. Cell Rep, 2020. **31**(6): p. 107615.
91. Koupenova, M., et al., *The role of platelets in mediating a response to human influenza infection*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1780.
92. May, A.E., P. Seizer, and M. Gawaz, *Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. s5-10.
93. Menter, D.G., et al., *Platelets and cancer: a casual or causal relationship: revisited*. Cancer Metastasis Rev, 2014. **33**(1): p. 231-69.
94. Coppinger, J.A., et al., *Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2096-104.

95. Dziedzic, A., et al., *Increased Pro-Thrombotic Platelet Activity Associated with Thrombin/PAR1-Dependent Pathway Disorder in Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(20).
96. Ferrarese, C., et al., *Decreased platelet glutamate uptake in patients with amyotrophic lateral sclerosis*. *Neurology*, 2001. **56**(2): p. 270-2.
97. Garlich, C.D., et al., *Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia*. *Stroke*, 2003. **34**(6): p. 1412-8.
98. Maglione, V., et al., *Adenosine A2A receptor dysfunction correlates with age at onset anticipation in blood platelets of subjects with Huntington's disease*. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2005. **139B**(1): p. 101-5.
99. Sanguigni, V., et al., *Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients*. *Circulation*, 2005. **111**(4): p. 412-9.
100. Stellos, K., et al., *Binding of oxidized low-density lipoprotein on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndromes and induces platelet adhesion to vascular wall in vivo--brief report*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(8): p. 2017-20.
101. Tunjungputri, R.N., et al., *The Inter-Relationship of Platelets with Interleukin-1beta-Mediated Inflammation in Humans*. *Thromb Haemost*, 2018. **118**(12): p. 2112-2125.
102. Hernandez, G., et al., *Participation of phospholipase-A2 and sphingomyelinase in the molecular pathways to eryptosis induced by oxidative stress in lead-exposed workers*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019. **371**: p. 12-19.
103. Cheng, Y.J., B.C. Yang, and M.Y. Liu, *Lead increases lipopolysaccharide-induced liver-injury through tumor necrosis factor-alpha overexpression by monocytes/macrophages: role of protein kinase C and P42/44 mitogen-activated protein kinase*. *Environ Health Perspect*, 2006. **114**(4): p. 507-13.
104. Guo, T.L., S.P. Mudzinski, and D.A. Lawrence, *The heavy metal lead modulates the expression of both TNF-alpha and TNF-alpha receptors in lipopolysaccharide-activated human peripheral blood mononuclear cells*. *J Leukoc Biol*, 1996. **59**(6): p. 932-9.
105. Lopez-Vanegas, N.C., et al., *Leukocyte apoptosis, TNF-alpha concentration and oxidative damage in lead-exposed workers*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020. **391**: p. 114901.
106. Mishra, K.P., et al., *Effect of lead exposure on the immune response of some occupationally exposed individuals*. *Toxicology*, 2003. **188**(2-3): p. 251-9.
107. Barman, T., R. Kalahasthi, and H.R. Rajmohan, *Effects of lead exposure on the status of platelet indices in workers involved in a lead-acid battery manufacturing plant*. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2014. **24**(6): p. 629-33.

108. Chwalba, A., et al., *The effect of occupational chronic lead exposure on the complete blood count and the levels of selected hematopoietic cytokines*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018. **355**: p. 174-179.
109. Dobrakowski, M., et al., *Blood morphology and the levels of selected cytokines related to hematopoiesis in occupational short-term exposure to lead*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016. **305**: p. 111-117.
110. Kianoush, S., et al., *Clinical, Toxicological, Biochemical, and Hematologic Parameters in Lead Exposed Workers of a Car Battery Industry*. *Iran J Med Sci* March 2013. **38**: p. 30-7.
111. Zeng, Z., et al., *Lead exposure is associated with risk of impaired coagulation in preschool children from an e-waste recycling area*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018. **25**(21): p. 20670-20679.
112. Nesaratnam, S., S. Bawa, and M.C. Scrutton, *Lack of an acute effect of Pb²⁺ on platelet aggregation*. *Thromb Haemost*, 1992. **68**(3): p. 373.
113. López, J.P., A. De la Peña, and G. Baños de Mac Carthy, *Effect of lead and cadmium on platelet aggregation*. *Arch Inst Cardiol Mex*, 1992. **62**: p. 317-24.
114. Sharp, D.S., et al., *Blood lead and platelet aggregation--evidence for a causal association*. *Thromb Haemost*, 1991. **66**(5): p. 604-8.
115. Gonzalez-Villalva, A., et al., *The effect of vanadium on platelet function*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2011. **32**(3): p. 447-56.
116. Al Doghaither, H., et al., *Roles of oxidative stress, apoptosis, and inflammation in metal-induced dysfunction of beta pancreatic cells isolated from CD1 mice*. *Saudi J Biol Sci*, 2021. **28**(1): p. 651-663.
117. Al-Ghafari, A., et al., *The heavy metals lead and cadmium are cytotoxic to human bone osteoblasts via induction of redox stress*. *PLoS One*, 2019. **14**(11): p. e0225341.
118. Yedjou, C.G. and P.B. Tchounwou, *N-acetyl-l-cysteine affords protection against lead-induced cytotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells*. *Int J Environ Res Public Health*, 2007. **4**(2): p. 132-7.
119. Davi, G., et al., *Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration*. *Circulation*, 2003. **107**(25): p. 3199-203.
120. Eibl, N., et al., *Improved metabolic control decreases platelet activation markers in patients with type-2 diabetes*. *Eur J Clin Invest*, 2004. **34**(3): p. 205-9.
121. Ferroni, P., et al., *Oxidant stress and platelet activation in hypercholesterolemia*. *Antioxid Redox Signal*, 2004. **6**(4): p. 747-56.
122. Ferroni, P., et al., *Platelet activation in type 2 diabetes mellitus*. *J Thromb Haemost*, 2004. **2**(8): p. 1282-91.

123. Morel, A., et al., *Relationship between the Increased Haemostatic Properties of Blood Platelets and Oxidative Stress Level in Multiple Sclerosis Patients with the Secondary Progressive Stage*. *Oxid Med Cell Longev*, 2015. **2015**: p. 240918.
124. Morel, A., et al., *Flow cytometric analysis reveals the high levels of platelet activation parameters in circulation of multiple sclerosis patients*. *Mol Cell Biochem*, 2017. **430**(1-2): p. 69-80.
125. Seghieri, G., et al., *Platelet antioxidant enzymes in insulin-dependent diabetes mellitus*. *Clin Chim Acta*, 2001. **309**(1): p. 19-23.
126. Sheremata, W.A., et al., *Evidence of platelet activation in multiple sclerosis*. *J Neuroinflammation*, 2008. **5**: p. 27.
127. Zhang, Y., et al., *Effects of Exenatide on Coagulation and Platelet Aggregation in Patients with Type 2 Diabetes*. *Drug Des Devel Ther*, 2021. **15**: p. 3027-3040.
128. Milton, N., *Homocysteine inhibits hydrogen peroxide breakdown by catalase*. *Open Enzyme Inhibition Journal*, 2008. **1**: p. 34-41.
129. Noichri, Y., et al., *Low erythrocyte catalase enzyme activity is correlated with high serum total homocysteine levels in Tunisian patients with acute myocardial infarction*. *Diagn Pathol*, 2013. **8**: p. 68.
130. Li, M., et al., *Nonlinear association between blood lead and hyperhomocysteinemia among adults in the United States*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 17166.
131. Chen, F., et al., *Effect of Elevated O₂⁻ and H₂O₂ Expression on Abnormal Activation of Platelets in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus*. *Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences)*, 2017. **6**: p. 56-62.
132. Masselli, E., et al., *ROS in Platelet Biology: Functional Aspects and Methodological Insights*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(14).
133. Walsh, T.G., et al., *The role of Nox1 and Nox2 in GPVI-dependent platelet activation and thrombus formation*. *Redox Biol*, 2014. **2**: p. 178-86.
134. Lachant, N.A., A. Tomoda, and K.R. Tanaka, *Inhibition of the pentose phosphate shunt by lead: a potential mechanism for hemolysis in lead poisoning*. *Blood*, 1984. **63**(3): p. 518-24.
135. Fidler, T.P., et al., *Superoxide Dismutase 2 is dispensable for platelet function*. *Thromb Haemost*, 2017. **117**(10): p. 1859-1867.
136. Burkhart, J.M., et al., *The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways*. *Blood*, 2012. **120**(15): p. e73-82.
137. Parascandolo, A. and M.O. Laukkanen, *Carcinogenesis and Reactive Oxygen Species Signaling: Interaction of the NADPH Oxidase NOX1-5 and Superoxide Dismutase 1-3 Signal Transduction Pathways*. *Antioxid Redox Signal*, 2019. **30**(3): p. 443-486.

138. Hwang, K.Y., et al., *Protein kinase C activity and the relations between blood lead and neurobehavioral function in lead workers*. Environ Health Perspect, 2002. **110**(2): p. 133-8.
139. Rendon-Ramirez, A.L., et al., *Effect of vitamin E and C supplementation on oxidative damage and total antioxidant capacity in lead-exposed workers*. Environ Toxicol Pharmacol, 2014. **37**(1): p. 45-54.
140. Freedman, J.E., *Oxidative stress and platelets*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. s11-6.
141. Handin, R.I., R. Karabin, and G.J. Boxer, *Enhancement of platelet function by superoxide anion*. J Clin Invest, 1977. **59**(5): p. 959-65.
142. Krotz, F., et al., *NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment*. Blood, 2002. **100**(3): p. 917-24.
143. Hubertus, K., et al., *Reciprocal regulation of human platelet function by endogenous prostanoids and through multiple prostanoid receptors*. Eur J Pharmacol, 2014. **740**: p. 15-27.
144. Petrucci, G., et al., *Prostaglandin E2 differentially modulates human platelet function through the prostanoid EP2 and EP3 receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **336**(2): p. 391-402.
145. Smith, J.P., et al., *PGE2 decreases reactivity of human platelets by activating EP2 and EP4*. Thromb Res, 2010. **126**(1): p. e23-9.
146. Fabre, J.E., et al., *Activation of the murine EP3 receptor for PGE2 inhibits cAMP production and promotes platelet aggregation*. J Clin Invest, 2001. **107**(5): p. 603-10.
147. MacIntyre, D.E. and J.L. Gordon, *Calcium-dependent stimulation of platelet aggregation by PGE*. Nature, 1975. **258**(5533): p. 337-9.
148. Iyu, D., et al., *The role of prostanoid receptors in mediating the effects of PGE(2) on human platelet function*. Platelets, 2010. **21**(5): p. 329-42.
149. Philipose, S., et al., *The prostaglandin E2 receptor EP4 is expressed by human platelets and potently inhibits platelet aggregation and thrombus formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(12): p. 2416-23.
150. Pitts, M.G. and S.E.F. D'Orazio, *Prostaglandin E2 Inhibits the Ability of Neutrophils to Kill Listeria monocytogenes*. J Immunol, 2019. **202**(12): p. 3474-3482.
151. Lang, E. and F. Lang, *Triggers, Inhibitors, Mechanisms, and Significance of Eryptosis: The Suicidal Erythrocyte Death*. BioMed Research International, 2015. **2015**: p. 513518.
152. Basaran, N. and U. Undeger, *Effects of lead on immune parameters in occupationally exposed workers*. Am J Ind Med, 2000. **38**(3): p. 349-54.

153. Dobrakowski, M., et al., *Association between subchronic and chronic lead exposure and levels of antioxidants and chemokines*. Int Arch Occup Environ Health, 2016. **89**(7): p. 1077-85.
154. Dobrakowski, M., et al., *Oxidative DNA damage and oxidative stress in lead-exposed workers*. Hum Exp Toxicol, 2017. **36**(7): p. 744-754.
155. Kasperczyk, S., et al., *The effect of occupational lead exposure on lipid peroxidation, protein carbonylation, and plasma viscosity*. Toxicol Ind Health, 2015. **31**(12): p. 1165-71.
156. Khan, D.A., et al., *Lead-induced oxidative stress adversely affects health of the occupational workers*. Toxicol Ind Health, 2008. **24**(9): p. 611-8.
157. Machon-Grecka, A., et al., *The influence of occupational chronic lead exposure on the levels of selected pro-inflammatory cytokines and angiogenic factors*. Hum Exp Toxicol, 2017. **36**(5): p. 467-473.
158. Stoleski, S., et al., *Adverse effects in workers exposed to inorganic lead*. Arh Hig Rada Toksikol, 2008. **59**(1): p. 19-29.
159. Turksoy, V.A., et al., *The effects of occupational lead exposure on selected inflammatory biomarkers*. Arh Hig Rada Toksikol, 2019. **70**(1): p. 36-41.
160. Yan, B. and J.W. Smith, *A redox site involved in integrin activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 39964-72.
161. Bennett, J.S., *Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3363-9.
162. Barbosa, F., Jr., R.F. Gerlach, and J.E. Tanus-Santos, *Matrix metalloproteinase-9 activity in plasma correlates with plasma and whole blood lead concentrations*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2006. **98**(6): p. 559-64.
163. Sheu, J.R., et al., *Expression of matrix metalloproteinase-9 in human platelets: regulation of platelet activation in in vitro and in vivo studies*. Br J Pharmacol, 2004. **143**(1): p. 193-201.
164. Lang, F., et al., *Ceramide in suicidal death of erythrocytes*. Cell Physiol Biochem, 2010. **26**(1): p. 21-8.
165. Chilton, F.H., M. Cluzel, and M. Triggianni, *Recent advances in our understanding of the biochemical interactions between platelet-activating factor and arachidonic acid*. Lipids, 1991. **26**(12): p. 1021-7.