



**Cinvestav**

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

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> Y ESFINGOMIELINASA COMO MECANISMOS MOLECULARES  
INVOLUCRADOS EN LA INDUCCIÓN DE ERIPTOSIS EN TRABAJADORES  
EXPUESTOS A PLOMO**

**TESIS**

**Que presenta**

**IBQ VILLANUEVA IBARRA CARLA ANGÉLICA**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOQUÍMICA**

Director de la Tesis: Dr. José Víctor Calderón Salinas.

Durante el desarrollo de este proyecto el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT con un número de beca 338532.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 25 del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN unidad Zacatenco

Este proyecto contó con el apoyo del Programa Nacional de Posgrados de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT 395096

El trabajo fue realizado gracias al apoyo del FOINS 214108.

## DEDICATORIA

A mi hijo

A mi amado hijo Jafet Alejandro por ser mi fuente de motivación para superarme cada día y concluir con este proyecto. Por traer alegría y felicidad a mi vida ¡Muchas gracias mi niño, te amo!

A mi Padre

Ramón Villanueva Pimentel le agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo incondicional. Gracias por estar siempre ahí, y por fomentar en mí el amor por mi profesión, eres un ejemplo a seguir, por ser una gran persona y un magnífico profesionalista sabes que eres el mejor papá de todo el mundo. ¡Te quiero mucho!

A mi madre

María Angélica Ibarra Camacho por haberme educado, por el amor incondicional que siempre me has brindado, por tus sabias palabras y consejos en los momentos difíciles, por ayudarme hacer una persona mejor cada día, más responsable, con valores, por tu gran dedicación, por el esfuerzo para que alcanzara este triunfo. ¡Gracias por darme la vida! ¡Te quiero mucho!

A mis hermanos

Dulce, Jesús Ramón y Paloma, porque siempre he contado con su apoyo, gracias por la paciencia y comprensión; por su amistad, aunque a veces tengamos nuestras diferencias, pero que hermanos no las tienen ¡Los quiero mucho!

A mis sobrinos

Leonardo e Isaac por traer alegría a mi vida y motivarme a lograr esta meta.

¡Les quiero mucho!

¡Muchas Gracias a todos!

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional unidad Zacatenco.

Al Dr. José Víctor Calderón Salinas, gracias por la oportunidad brindada para ser parte de su equipo de trabajo, sobre todo por confiar en mí. Por sus consejos, por su apoyo y sus experiencias tanto profesionales como humanas durante la realización de mi trabajo profesional.

Al Dr. Jorge Cerbón y Dr. Olivares por sus comentarios, recomendaciones, puntos de vista y sabios consejos que sin duda enriquecieron el contenido de este trabajo.

A la Q. F. I. Margarita Rosas Flores y Sr. Héctor Camacho Pérez, auxiliar y técnico en investigación respectivamente, del Laboratorio de Bioquímica Médica, por compartir conocimientos, por su apoyo, paciencia y gran disposición.

A mis compañeros de laboratorio Nati, Fátima, Nadia, Mireille, Carlos, Sandra, por su apoyo incondicional.

A mis compañeros de generación y del departamento de bioquímica.

A todas las personas que me apoyaron durante este proyecto Flor Bracamontes, Sara Reyna, Ahtziri Romero.

## INDICE

TABLA DE FIGURAS .....	4
RESUMEN .....	5
ABSTRACT .....	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Plomo.....	7
1.2 Ingreso, distribución y eliminación del plomo.....	7
1.3 Efectos del plomo a nivel molecular.....	9
1.4 Intoxicación con plomo.....	11
1.5 Estrés oxidativo.....	12
1.5 Defensas antioxidantes.....	12
1.5.1 Mecanismos de defensa antioxidante.....	13
1.6 Parámetros de diagnóstico de intoxicación por plomo.....	16
1.6.1 En sangre.....	16
1.6.2 En orina.....	17
1.6.3 Pruebas de daño específicas.....	18
1.6.4 Pruebas de daño no específicas.....	18
1.7 Normas regulatorias.....	19
1.8 Eritrocitos.....	20
1.8.1 Eritrocitos y plomo.....	21
1.8.2 Eritrocitos y daño oxidativo.....	22
1.9 Eriptosis.....	23
1.9.1 Mecanismos involucrados en eriptosis.....	24
1.10 Fosfolípidos.....	25

1.10.1 Fosfolipasas.....	26
1.11 Esfingolípidos.....	26
1.11.1 Esfingomielinasa.....	27
II. ANTECEDENTES.....	28
III. JUSTIFICACIÓN .....	31
IV. HIPÓTESIS .....	33
V. OBJETIVOS.....	34
VI. METODOLOGÍA.....	35
6.1 Obtención de muestras .....	35
6.2 Determinación de concentración de plomo en sangre .....	35
6.3 Determinación de la enzima $\delta$ -ALA-D .....	35
6.4 Determinación de lipoperoxidación en eritrocitos por colorimetría .....	36
5.5 Evaluación de capacidad antioxidante en plasma.....	37
5.6 Análisis por citometría de flujo de la externalización de FS en eritrocitos ....	37
5.7 Determinación de la actividad de PLA <sub>2</sub> por fluorescencia.....	38
5.8 Determinación de la actividad de esfingomielinasa por fluorescencia .....	38
5.9 Análisis estadístico de los datos .....	39
VII. RESULTADOS .....	40
7.1 Análisis demográfico .....	40
7.2 Concentración de plomo en sangre .....	40
7.3 Determinación de la actividad de la enzima $\delta$ -ALAD .....	42
7.4 Determinación de lipoperoxidación .....	43
7.5 Determinación de capacidad antioxidante total.....	46
7.6 Externalización de fosfatidilserina .....	48
7.7 Determinación de la actividad de la enzima PLA <sub>2</sub> .....	49

7.8	Determinación de la actividad de la enzima esfingomielinasa .....	50
VIII.	DISCUSIÓN.....	52
8.1	Intoxicación por plomo en trabajadores expuestos .....	52
8.2	Daño oxidativo en trabajadores expuestos a plomo.....	54
8.3	Incremento de la eriptosis en trabajadores expuestos a plomo. ....	55
IX.	CONCLUSIONES.....	60
X.	PERSPECTIVAS .....	61
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

## TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de absorción, distribución y eliminación del plomo en el organismo (Calderón y Maldonado, 2008). .....	9
Figura 2. Mecanismos moleculares involucrados en eriptosis (Quintanar y Calderón, 2006).....	30
Figura 3. Concentración de plomo en sangre, determinados por voltametría, en grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo.....	41
Figura 4. Determinación de la actividad de la enzima d-ALAD.....	42
Figura 5. Correlación entre concentración de plomo en sangre y actividad de la enzima d-ALAD de grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo.....	43
Figura 6. Concentración de especies reactivas a ácido tiobarbitúrico en eritrocitos .....	44
Figura 7. Correlación entre concentración de plomo en sangre y concentración de especies reactivas a ácido tiobarbitúrico en eritrocitos de grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo .....	45
Figura 8. Correlación entre actividad de la enzima d-ALAD y concentración de especies reactivas a ácido tiobarbitúrico en eritrocitos de grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo .....	46
Figura 9. Determinación de capacidad antioxidante total en plasma, determinados por espectrofotometría, en grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo. ....	47
Figura 10. Correlación entre concentración de plomo en sangre y capacidad antioxidante total en plasma grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo .....	48
Figura 11. Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos.....	49
Figura 12. Actividad de fosfolipasa A <sub>2</sub> en eritrocitos.....	50
Figura 13. Actividad de esfingomielinasa en eritrocitos. ....	51
Figura 14. Esquema de vía propuesta para eriptosis en intoxicación por plomo .	59



## RESUMEN

Debido a las propiedades físico-químicas, el plomo es extensamente utilizado, por lo que muchos trabajadores continúan siendo expuestos a este metal. Los eritrocitos juegan un papel primordial en la toxicidad del plomo debido a que constituyen un medio de distribución al resto de órganos y tejidos; la concentración en eritrocitos es 90 veces más alta que en el plasma. Se ha demostrado que la intoxicación por plomo provoca daño oxidativo en eritrocitos, caracterizado por oxidación de lípidos y proteínas; el daño oxidativo se ha asociado con un incremento de la apoptosis del eritrocito (eriptosis), que constituye la muerte celular programada del eritrocito. Se ha propuesto que en el desarrollo de la eriptosis se activa un conjunto de vías que pueden incluir: incremento de la concentración de calcio intracelular libre, de ceramidas y de prostaglandina-E<sub>2</sub>; la activación de caspasas, de canales iónicos, de esfingomielinasa y la translocación de fosfatidilserina a la interface externa de la membrana del eritrocito, lo que permite que los eritrocitos sean identificados por macrófagos circulantes o por macrófagos del sistema retículo endotelial y sean fagocitados. Algunas de estas vías ya se han estudiado para pacientes expuestos a plomo. El objetivo del presente trabajo es analizar la actividad de la esfingomielinasa y la fosfolipasa A<sub>2</sub> como mecanismos moleculares involucrados en la inducción de eriptosis en trabajadores expuestos a plomo. Se estudió un grupo de 30 trabajadores de la industria de reciclado de baterías con un tiempo de exposición al plomo de entre 2 y 17 años, al que nuestro grupo de trabajo demostró presenta un incremento de eriptosis inducida por intoxicación por plomo, comparándolo con un grupo no expuesto conformado por individuos sin antecedentes de exposición a plomo. Se han realizado pruebas utilizadas en el diagnóstico de intoxicación por plomo, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en la concentración de plomo en sangre, lipoperoxidación en eritrocitos, capacidad antioxidante en plasma, actividad de la enzima ácido-delta aminolevulínico deshidratasa, en la externalización de fosfatidilserina en eritrocitos y en las actividades de las enzimas fosfolipasa A<sub>2</sub> y esfingomielinasa, estas últimas participan en el proceso de eriptosis.

## **ABSTRACT**

Due to the physicochemical properties, lead is widely used, so that many workers continue to be exposed to this metal. Erythrocytes play a primary role in the toxicity of lead because they constitute a means of distribution to the rest of organs and tissues; the concentration in erythrocytes is 90 times higher than in the plasma. It has been shown that lead poisoning causes oxidative damage in erythrocytes, characterized by oxidation of lipids and proteins; oxidative damage has been associated with an increase in erythrocyte apoptosis (eryptosis), which is the programmed cell death of the erythrocyte. It has been proposed that in the development of eryptosis a set of pathways is activated that may include: increase in the concentration of free intracellular calcium, ceramides and prostaglandin-E<sub>2</sub>; the activation of caspases, ion channels, sphingomyelinase and the translocation of phosphatidylserine to the outer interface of the erythrocyte membrane, which allows erythrocytes to be identified by circulating macrophages or by macrophages of the reticuloendothelial system and to be phagocytosed. Some of these routes have already been studied for patients exposed to lead. The objective of the present work is to analyze the activity of sphingomyelinase and phospholipase A<sub>2</sub> as molecular mechanisms involved in the induction of eryptosis in workers exposed to lead. We studied a group of 30 workers of the battery recycling industry with lead exposure time between 2 and 17 years, which our group showed an increase in lead-induced eryptosis, comparing it with a group not exposed conformed by individuals with no history of exposure to lead. Tests used in the diagnosis of lead poisoning have been performed, finding statistically significant differences between both groups in blood lead concentration, lipoperoxidation in erythrocytes, antioxidant capacity in plasma, acid-delta aminolevulinic dehydratase enzyme activity, in outsourcing of phosphatidylserine in erythrocytes and in the activities of the enzymes phospholipase A<sub>2</sub> and sphingomyelinase, the latter involved in the process of eryptosis.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Plomo**

El plomo denominado con el símbolo Pb, con peso atómico de 207.19, es un metal pesado de color gris azulado, maleable, dúctil y difícil de corroer. Tiene 4 isótopos naturales, de pesos atómicos 208, 206, 207, 204. Posee 4 electrones en su órbita de valencia, de los que sólo 2 se ionizan con facilidad, por lo que el estado de oxidación de este metal en sus compuestos inorgánicos es, en general, de +2. Se localiza en el grupo IV de la tabla periódica, pero en muchas de sus propiedades se asemeja a los metales alcalinotérreos. Forma complejos con muchas biomoléculas, uno de los más estables es con los residuos de aminoácidos que contienen grupos –SH. En consecuencia, el plomo puede afectar las propiedades biológicas de las proteínas.

Los principales usos de este metal y sus compuestos son: en baterías, pigmentos, aleaciones, cerámica, plásticos, municiones, soldaduras, cubiertas de cables, plumas y armamento. También se ha usado en la fabricación de ácido sulfúrico, en el refinamiento de petróleo, reacciones de halogenación y sulfonación. Además de su uso para atenuar ondas de sonido, radiación atómica y vibraciones. En estas últimas aplicaciones, se aprovecha la suavidad y alta densidad del plomo para formar las aleaciones correspondientes.

### **1.2 Ingreso, distribución y eliminación del plomo**

Como se muestra en la figura 1 el plomo se encuentra en el alimento, agua o aire y puede entrar al organismo por medio de tres vías, la piel, el sistema digestivo y el sistema respiratorio, las dos últimas tienen mayor importancia. El plomo llega al torrente circulatorio una vez que se absorbe. La absorción se ve influenciada no solo por la concentración del metal, sino también por varios parámetros físicos y químicos de las partículas y las sales, así como de los factores propios del huésped, tales como la edad y el estado nutricional (Calderón y Maldonado, 2008).

Por la vía gastrointestinal, la absorción varía con la edad y estado nutricional, los adultos absorben en promedio el 15% y los niños el 50% de plomo ingerido. Por inhalación el grado de absorción varía de la forma en que se presenta, vapores o partículas, aproximadamente del 30 al 40% del plomo inhalado llega al torrente sanguíneo (Calderón y Maldonado, 2008).

En sangre el plomo se almacena principalmente en el eritrocito de un 90-99% mientras que en el plasma de un 1-10% (figura 1)

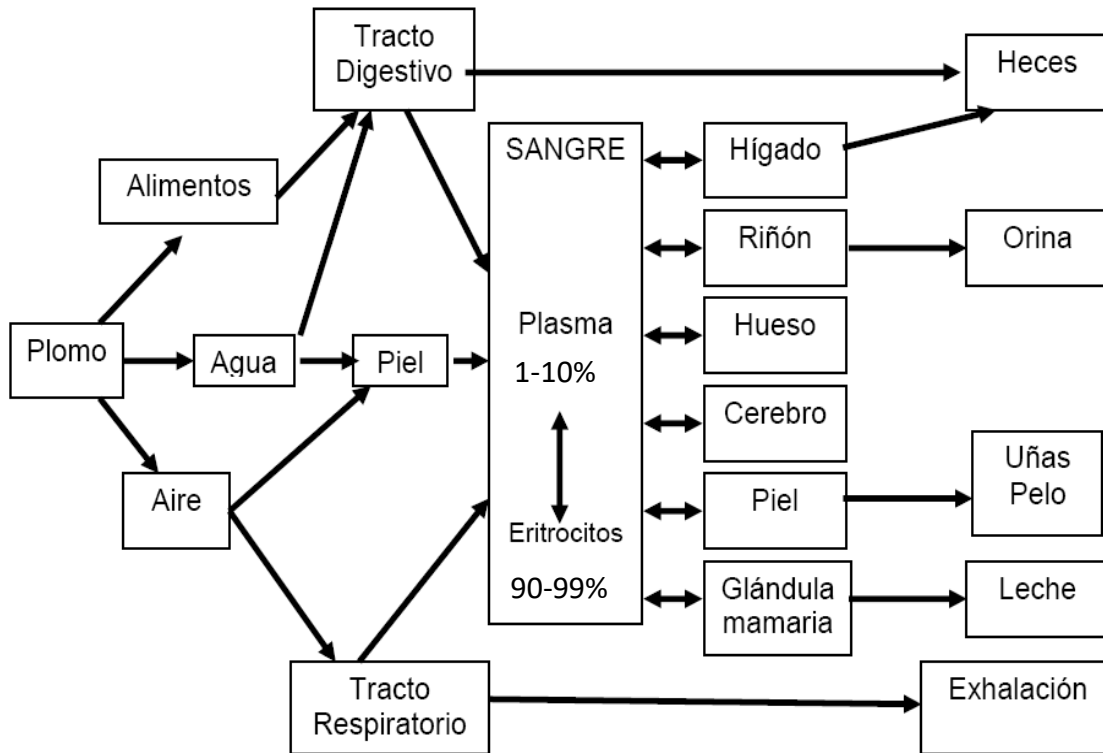
La eliminación del plomo es básicamente por la vía urinaria, la vida media en la sangre es larga, dado que la eliminación de plomo de la sangre es de uno a dos meses (Cabrera y Cureño, 2006).

El plomo se acumula en el hueso y su eliminación es muy lenta; la vida media del plomo en el hueso es de 20 a 30 años (Calderón y Maldonado, 2008).

En la sangre, un nivel de Pb  $\leq 10$   $\mu\text{g/dL}$  se considera no tóxico en adultos y mujeres no embarazadas o en periodo de lactancia; sin embargo, una concentración de 10 a 25  $\mu\text{g/dL}$  se relaciona con el deterioro neuroconductual y daño renal; valores de  $\geq 80$   $\mu\text{g/dL}$  con encefalopatías e insuficiencia renal (Cabrera y Cureño, 2006).

El plomo se absorbe en el tracto gastrointestinal a través de los transportadores del calcio. La absorción intestinal del plomo tiene una relación inversa con el contenido de calcio en la dieta; esto es, que a mayor contenido de calcio en la dieta existe una menor absorción de plomo. Así mismo la fibra soluble o insoluble en los alimentos puede formar complejos con plomo, evitar su ingreso y llevarlo a las heces fecales, para su expulsión, reduciendo su absorción (figura 1).

Hay ciertos factores que propician la absorción del plomo por la vía intestinal como son el embarazo, lactancia, crecimiento, menopausia y otros procesos que aumenten la demanda de calcio (Calderón y Maldonado, 2008).



**Figura 1.** Diagrama de absorción, distribución y eliminación del plomo en el organismo (Calderón y Maldonado, 2008).

### 1.3 Efectos del plomo a nivel molecular

Una vez que el plomo se distribuye en el organismo puede dañar directa o indirectamente, dependiendo de su concentración en las células, los aparatos y los sistemas, así como de la respuesta del organismo y la susceptibilidad individual.

La base molecular de la toxicidad por plomo radica en las diferentes formas que tiene para interactuar con las macromoléculas. Son diferentes procesos los que causan los mecanismos tóxicos del plomo que afectan a la maquinaria molecular de los organismos vivos: por uniones covalentes a proteínas (Goering, 1993), daño molecular oxidativo (Gurer-Orhan, et al, 2004) y la interacción con los sitios estereo-específicos para cationes divalentes como el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Garza et al, 2006).

La interacción con los sitios estereo-específicos para cationes divalentes afecta diferentes procesos biológicos dependientes de calcio, como el transporte, el metabolismo, la energía, la apoptosis, la conducción iónica, la adhesión celular, la

interacción y la señalización intracelular, los procesos enzimáticos y la regulación genética (Garza et al., 2006). El plomo es un elemento con efectos en los organismos debido a su capacidad para unirse a las macromoléculas, incluyendo la hemoglobina, diversas enzimas, al RNA y al DNA (Castillo et al., 2005). El plomo también puede afectar la formación de macromoléculas, como es el caso en el que inhibe la formación del ácido delta amino levulínico que participa en la síntesis de la hemoglobina (Rivera, 2004).

El plomo puede unirse a los grupos sulfhídricos de las cisteínas, con los cuales forma complejos llamados mercáptidos (Wada et al., 1976). El plomo también puede interaccionar con las proteínas por uniones estereo específicas compitiendo con otros cationes de importancia biológica, por ejemplo los que se encuentran en el sitio activo de algunas proteínas, como es el caso de la calmodulina la cual forma un complejo con el  $\text{Ca}^{2+}$  para ser activada. Se sabe que esta proteína no cuenta con grupos sulfhídricos por lo que se ha propuesto que el plomo se puede unir en forma estereo-específica formando un complejo plomo-calmodulina capaz de funcionar en forma semejante que el complejo formado con el  $\text{Ca}^{2+}$  (Miranda, 1994). Las uniones electrostáticas del plomo se presentan en sitios de macromoléculas con alta densidad de carga negativa; es una unión reversible en medios con alta fuerza iónica o cambios en la concentración de otros cationes. El plomo puede acercarse a los ácidos nucleicos y unirse a ellos debido a la alta densidad de carga negativa que tienen estas macromoléculas. En el caso de las uniones estereo específicas, el plomo frecuentemente tiene mayor afinidad para unirse a las macromoléculas que la afinidad del catión divalente biológicamente activo. La unión del plomo a estas macromoléculas puede resultar en una reducción de la función de la macromolécula, es decir en un antagonismo con el catión biológicamente activo; en otros casos dicha unión puede resultar en una activación incluso mayor que la que tenía el catión biológicamente activo, tornando al plomo en un agonista más potente. En otras macromoléculas, el plomo interactuando en el sitio estereo específico solo bloquea la acción del catión biológicamente activo, sin reducir o incrementar la función y en este caso actúa como un bloqueador o inhibidor de la función, es decir, la interacción del plomo en sitios estereo

específicamente diseñados para los cationes divalentes biológicamente activos puede resultar en aumentar, disminuir o bloquear la función.

El  $\text{Ca}^{2+}$  es el catión más frecuentemente sustituido por el plomo debido a que tienen características físicoquímicas semejantes, tales como la electronegatividad, la valencia y el radio iónico. Lo anterior explica porque el plomo puede entrar al organismo por vía digestiva a partir de los transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , entrar por canales y salir por transporte activo de las células de la misma forma como lo hace el  $\text{Ca}^{2+}$ , y su acumulación en el hueso sustituyendo al  $\text{Ca}^{2+}$  en las sales de fosfato (apatita e hidroxiapatita). Esta semejanza con el  $\text{Ca}^{2+}$  y las posibilidades de que el plomo actúe directa o indirectamente sobre los sistemas de transporte y los sistemas de la regulación de la distribución del  $\text{Ca}^{2+}$ , provoca a su vez que el plomo afecte el ingreso, la distribución y la excreción del propio  $\text{Ca}^{2+}$  (Richardt et al., 1986).

#### **1.4 Intoxicación con plomo**

El plomo actúa de manera tóxica por bloqueo de grupos funcionales, desplazando a otros iones metálicos esenciales como Ca, Zn, Cu, Fe, modificando la conformación activa de las moléculas biológicas (Manzanares *et al.*, 2005).

La propensión del plomo para catalizar reacciones de oxidación y generar especies reactivas de oxígeno se ha demostrado en varios estudios. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) inhiben la producción de antioxidantes sulfhidrilo, inhibe las reacciones enzimáticas que menoscaban la producción de hemo, causan inflamación en las células endoteliales vasculares, daña a los ácidos nucleicos e inhibe la reparación del ADN, además de iniciar la peroxidación de lípidos en las membranas celulares.

La intoxicación por plomo induce la inhibición de la síntesis del grupo hemo y la acumulación de pro-oxidantes y sustratos autooxidables como el ácido aminolevulínico, grupos hemo libres e iones de hierro libres en los eritrocitos; a su vez, la acumulación de sustratos oxidables puede resultar en la formación de

superóxido y peróxido de hidrógeno (Patrick, 2006). El plomo interfiere en la síntesis del grupo hemo dada su capacidad de alterar la actividad de algunas enzimas que forman parte de esta vía metabólica, como las enzimas ácido  $\delta$ -aminolevulínico sintetasa ( $\delta$ -ALAS), ácido  $\delta$ -aminolevulínico dehidratasa ( $\delta$ -ALAD) y ferroquelatasa (Needleman, 2004).

### **1.5 Estrés oxidativo**

En las células y en los organismos en condiciones normales se mantiene un balance entre la producción de radicales libres y especies reactivas con los sistemas antioxidantes; de manera tal que la toxicidad por oxidación es limitada. Aún este limitado daño es parcialmente responsable del envejecimiento natural de las células y los organismos. Sin embargo, se considera que la agresión oxidativa alcanza niveles patológicos cuando se rompe el balance entre ella y la eficiencia de los sistemas amortiguadores antioxidantes; lo cual se puede producir por un déficit de antioxidantes o por un incremento en la producción de las especies reactivas.

El estrés oxidativo al que se somete una célula o el organismo puede ser eficiente y limitar el daño o ser ineficiente y no poder evitar el incremento del daño, lo cual puede depender de la intensidad del insulto o de la falta de elementos de respuesta en los sistemas antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 2002).

Alteraciones en la homeostasis redox pueden promover la muerte celular o la supervivencia celular, dependiendo de la magnitud de los estímulos porque la alteración del potencial redox puede contribuir al desarrollo de las enfermedades (Trachootham, 2008)

### **1.5 Defensas antioxidantes**

Antioxidante se define como una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Mientras que la oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante que pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células, los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del



radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos (Diccionario de la Universidad de Salamanca, 2011).

### **1.5.1 Mecanismos de defensa antioxidante**

En forma general se conocen como mecanismos antioxidantes a los sistemas encargados de proteger a las células de los efectos de los radicales libres, reaccionando con ellos o convirtiéndolos en especies menos reactivas mediante acción enzimática.

Para evitar que se desborde el insulto oxidativo, las células y los organismos aeróbicos requieren generar y mantener defensas antioxidantes de manera óptima (Quintanar y Calderón, 2009). Los mecanismos antioxidantes se pueden clasificar de diversas formas; la siguiente clasificación se basa en las líneas de defensa del organismo:

#### a) Macromoléculas

Macromoléculas que acomplejan especies reactivas y evitan su acción. Por ejemplo, proteínas que acumulan o transportan metales de transición, como la transferrina y la ceruloplasmina o como el oxígeno, la hemoglobina y la mioglobina (Quintanar y Calderón, 2009).

#### b) Enzimas antioxidantes

Enzimas antioxidantes con gran afinidad para catalizar con altas velocidades la reacción de reducción parcial de una especie reactiva. Por ejemplo: la superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del  $O_2$  a  $H_2O_2$ ; la glutatión peroxidasa (GPx) que es una enzima dependiente de selenio y cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o lipoperóxidos (L-OOH); la glutatión sulfhidril transferasa (GST) que cataliza el ataque nucleofílico del co-sustrato GSH sobre el centro electrófilo de un gran número de oxidantes y la catalasa (CAT) que reduce el  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (Quintanar y Calderón, 2009).

#### c) Co-sustratos antioxidantes

Son empleados por las enzimas para poder reducir parcialmente a los radicales libres y las especies reactivas. Por ejemplo: el glutatión y el NADPH. El glutatión es un tripéptido ( $\gamma$ -glutamilcisteinil-glicina) con gran facilidad para ceder electrones (muy nucleofílico) debido a su grupo sulfhidrilo (-SH) y su potencial redox; una vez que queda oxidado se puede regenerar gracias a la enzima glutatión reductasa (GR) que lo reduce con la oxidación de NADPH. El NADPH tiene un potencial redox muy negativo y por ende es un importante donador de electrones e hidrógenos, con lo que puede pasar a NADP<sup>+</sup> que en su forma oxidada diversas enzimas lo emplean como co-sustrato (Calderón y Quintanar, 2009).

d) Enzimas que regeneran sustratos o co-sustratos antioxidantes

Enzimas que regeneran sustratos o co-sustratos antioxidantes. Por ejemplo, las enzimas que regeneran al glutatión reducido, la vitamina E y el NADPH. El glutatión se mantiene casi todo en forma reducida principalmente a través de glutatión reductasa (GR), una flavoenzima que gracias a la oxidación del NADPH cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). La vitamina E al actuar como antioxidante se oxida a tocoferilquinona; para continuar su trabajo antioxidante se requiere que se reduzca nuevamente a vitamina E. Tal reducción la pueden llevar a cabo el ascorbato (vitamina C) o el glutatión con la catálisis de las enzimas tocoferilquinona reductasa o una GPx, respectivamente (Calderón et al., 1999).

El ascorbato se oxida a deshidroascorbato y se puede reducir a ascorbato con NADPH o con GSH por enzimas tales como las deshidroascorbato reductasa (DAR) o por la glutatión peroxidasa (GPx). El NADPH se regenera principalmente a través de la vía de las pentosas a partir del NADP<sup>+</sup>, por acción de la deshidrogenasa de la glucosa-6-P y la deshidrogenasa de gluconato-6-P; sin embargo, en algunas células la enzima málica/NADP<sup>+</sup> (MDP), que oxida malato a piruvato, puede contribuir a la formación de NADPH o bien obtenerse a partir de la isocitrato deshidrogenasa citosólica (IDPc) dependiente de NADP<sup>+</sup> que cataliza la reacción de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato (Calderón y Quintanar, 2009).

#### e) Antioxidantes exógenos

Son antioxidantes que provienen de la dieta, tales como la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), el  $\beta$ -caroteno (provitamina A), el cobre, el selenio, el zinc, el manganeso, los polifenoles, los licopenos, los flavonoides, la quercitina, la hespiridina, las catequinas y los taninos (Rendón et al., 2007).

#### f) Antioxidantes endógenos

Los antioxidantes son moléculas nucleofílicas con gran afinidad y que se comportan como compuestos muy susceptibles para que los oxiden las especies reactivas (electrofílicas); es decir, ofrecen electrones a las especies reactivas para evitar que estas ataquen a las macromoléculas nucleofílicas necesarias para la función y estructura celular (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos). Una vez que los radicales libres reaccionan con los antioxidantes se reducen parcialmente o se unen en forma de aductos, reduciendo su reactividad y oxidando al antioxidante. Ejemplos de estos antioxidantes en los organismos son: el glutatión, el NADPH, la albúmina, el ácido úrico, la coenzima Q, la bilirrubina y la melatonina (Quintanar y Calderón, 2009).

#### g) Sistema de reparación

Son sistemas que tratan de recuperar la función de las macromoléculas dañadas, reparar el daño establecido o destruir la macromolécula que pudiera causar daño a la economía celular. Hay mecanismos de reparación específicos que sustituyen las bases mal apareadas, oxidadas, desaminadas o que añaden la base faltante y otros que degradan un tramo de nucleótidos en una hebra alrededor de la región alterada, posteriormente una polimerasa de ADN y una ligasa de ADN reparan el tramo.

Los enlaces tiol (sulfhidrilo) de las proteínas pueden ser nuevamente reducidos por la enzima tiorreductasa (TR), empleando glutatión como donador de electrones y regulando sistemas efectores y de balances oxidorreductores como señales intracelulares y como moléculas efectoras. La enzima metionina sulfóxido

reductasa, reduce los sulfóxidos de metionina de las proteínas dañadas, en una reacción dependiente del NADPH.

Los daños producidos por radicales libres en términos generales marcan a las proteínas para su degradación. El reconocimiento de los sitios oxidados o halogenados o bien la exposición de regiones hidrofóbicas determinan la ubiquitinación de las proteínas y su degradación en el proteosoma.

En el caso de los lipoperóxidos se pueden reducir mediante GPx de fosfolípidos o son eliminados a través de las fosfolipasas como la fosfolipasa A<sub>2</sub>, que aumenta su actividad durante la agresión oxidativa. El uso extensivo de sistemas de reparación o el intenso daño al DNA puede inducir el proceso de apoptosis, que visto de esta manera sería la muerte por suicidio cuando la reparación es imposible o el daño fue extensivo, protegiendo al órgano y al organismo de daños locales y sistémicos, incluyendo el desarrollo de células cancerosas (Calderón y Quintanar, 2009).

## **1.6 Parámetros de diagnóstico de intoxicación por plomo**

El diagnóstico de la toxicidad del plomo se ha basado tradicionalmente en los niveles de plomo en sangre significativamente elevados. Sin embargo, los datos de exposiciones de bajo nivel y los niveles de plomo en sangre previamente considerados normales se ha relacionado como factores causantes de la disfunción cognitiva, trastornos neuroconductuales, daño neurológico, la hipertensión y la insuficiencia renal (Patrick, 2006).

El diagnóstico por la sintomatología clínica es muy difícil en las etapas iniciales. En etapas avanzadas o en condiciones agudas con altas concentraciones de plomo en sangre, el diagnóstico es más sencillo, pero la mayoría de las veces demasiado tarde para el paciente y con pocas oportunidades de intervención.

### **1.6.1 En sangre**

Después de la exposición al plomo, e se absorbe y es transportado por el torrente sanguíneo a otros tejidos. Una vez absorbido, este plomo se acumula en tres

compartimentos: sangre, los tejidos blandos y hueso. En la sangre, aproximadamente el 99% del plomo se encuentra en los eritrocitos, dejando alrededor de 1% en plasma. (Figura 1).

La cinética de transferencia de plomo en la sangre a los tejidos blandos es baja y tarda aproximadamente 4 a 6 semanas. El plomo en la sangre tiene una vida media estimada de 35 días, en tejido blando de 40 días, y en los huesos 20 a 30 años. La vida media biológica de plomo puede ser considerablemente mayor en los niños que en los adultos. La concentración de plomo en sangre refleja la ingesta de plomo anterior de 3 a 5 semanas y por lo tanto no se puede utilizar como índice único y confiable de exposición crónica (Papanikolaou et al., 2005).

La prueba más frecuente y de mayor valor diagnóstico para el estudio de la intoxicación con plomo es la determinación de plomo en sangre, la cual se puede realizar básicamente a través de tres técnicas; la espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, la espectrofotometría de plasma y la voltametría. Las tres tienen muy buena sensibilidad y reproducibilidad, pero la de voltametría es la técnica más rápida, de menor costo y con menos necesidad de procesar la muestra (Calderón y Maldonado, 2008).

### **1.6.2 En orina**

Sin duda, el sistema de excreción renal es la principal y más abundante forma de eliminar el plomo del organismo. Existen dos formas para lograr la eliminación, una de ellas a partir de la secreción por las células del túbulo contorneado proximal y la otra (la mayor) por una filtración glomerular, ambas similares a la forma de excreción del calcio. (Calderón y Maldonado, 2008).

Medir el plomo en la orina se puede realizar cuando no se puede hacer alguna técnica invasiva, como es la obtención de una muestra de sangre venosa; sin embargo, esta facilidad no compensa los problemas intrínsecos de la prueba. La concentración del plomo en la orina depende de las condiciones previas a la toma de la muestra; se puede tener una orina diluida o concentrada, lo que influye

fuertemente en el resultado, además de las concentraciones, requerimientos, ingesta y estado fisiológico del calcio y de los fosfatos en el organismo. Una mejor determinación la puede ofrecer el medir la concentración de plomo en la orina de 24 horas y corregirla por la dilución, la filtración glomerular y la reabsorción tubular. Este procedimiento, sin duda de mayor precisión que el anterior, tiene dificultades técnicas para obtener el total de la orina de 24 horas del paciente y también ofrece un panorama parcial de la movilización de plomo en el organismo, además de tener que realizar determinaciones de urea y creatinina o pruebas de depuración de creatinina para poder compensar por el estado de la función renal.

### **1.6.3 Pruebas de daño específicas**

Son aquellas donde el plomo y solo un número muy limitado de padecimientos las pueden alterar; por ejemplo, la actividad de la enzima delta aminolevulinico deshidratasa ( $\delta$ -ALA-D) en sangre, que se disminuye cuando hay intoxicación con plomo; la concentración de protoporfirinas eritrocitarias libres, que se incrementan en el eritrocito cuando el plomo inhibe la ferroquelatasa que las transforma en hemo y; la concentración de ácido delta aminolevulinico en sangre o en orina, que se incrementa por la inhibición que ejerce el plomo sobre la enzima delta amino levulinico deshidratasa. La actividad de la  $\delta$ -ALA-D es una prueba muy sensible y con buena especificidad para la intoxicación por plomo, esta prueba colorimétrica es fácil de realizar en cualquier laboratorio, es la prueba de elección para evaluar el daño inducido por el plomo. La enzima aminolevulinico deshidratasa es una proteína citoplasmática importante que cataliza la síntesis de porfobillinogeno a partir de dos moléculas de ácido aminolevulinico (Rendón *et al.*, 2007).

### **1.6.4 Pruebas de daño no específicas**

Los indicadores inespecíficos no indican que hay daño específico debido al plomo, pero permiten identificar daños inducidos por el plomo o que coexisten en el proceso tóxico.

La evaluación del daño oxidativo, la prueba más sencilla y recomendada es la determinación de la concentración de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en sangre para determinar el grado de peroxidación lipídica de eritrocitos y de lípidos de lipoproteínas. Esta prueba permite conocer la intensidad de daño en un paciente al que se le ha diagnosticado intoxicación con plomo (Calderón y Maldonado, 2008).

Otra de las pruebas es la determinación de la capacidad energética del eritrocito mediante bioluminiscencia debido a que la síntesis de ATP se ve disminuida ante la exposición al plomo.

Al estudiar la sangre periférica se pueden observar megaloblastos, eritroblastos poliploides y punteado basófilo en los eritroblastos. La acción inhibitoria del plomo sobre la enzima pirimidin-5-nucleotidasa es la responsable de la reducción-degradación del RNA en los reticulocitos en vías de maduración y de la persistencia de las granulaciones basófilas (Arrate P.M., Nieves R.S.H., & Amaia, 1999).

Cuando ocurre una intoxicación por plomo existe un incremento en la eriptosis. La eriptosis es un tipo de apoptosis que sucede en el eritrocito (Quintanar y Calderón, 2006). Se puede detectar la fosfatidilserina que es un tipo de fosfolípido que en células viables se mantiene en la monocapa interior de la membrana celular. Cuando se empieza a desencadenar el proceso de la apoptosis, la fosfatidilserina migra a la capa externa de dicha membrana.

## **1.7 Normas regulatorias**

**NOM-199-SSA1-2000, Salud ambiental. Niveles de plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente.**

Esta norma oficial mexicana establece los niveles de plomo en sangre y las acciones básicas de prevención y control en población expuesta no ocupacionalmente.

Los valores criterios que se utilizarán como referencia para determinar los niveles de concentración de plomo en sangre son los siguientes:

- El valor criterio para la concentración de plomo en sangre en niños, mujeres embarazadas y en periodo de lactancia es de 10 µg/dL.
- El valor criterio para la concentración de plomo en sangre para el resto de la población expuesta no ocupacionalmente es de 25 µg/dL.

### **NOM-047-SSA1-2011, Salud ambiental-Índices biológicos de exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas.**

El objetivo de esta norma es establecer los índices biológicos de exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas, como una medida para apoyar la detección de los niveles de riesgos a la salud en función de la exposición a las sustancias químicas en los establecimientos y para apoyar las medidas de higiene industrial y de protección a la salud del personal.

El valor criterio para la concentración de plomo en sangre es de 30 µg/gL. Las mujeres en periodo fértil, donde el plomo en sangre exceda 10 µg/dL están en riesgo de tener niños con plomo en sangre por arriba del valor guía recomendado por el centro de control de enfermedades de los EEUU (CDC).

### **1.8 Eritrocitos**

Los eritrocitos de humanos han sido considerados como simples momias de células; sacos de membranas con hemoglobina que flotan en la circulación. Los eritrocitos en el humano tienen una vida media de 120 días, tiempo aproximado en el que se producen señales moleculares de envejecimiento y es retirado de la circulación.

La función principal de los eritrocitos es la de transportar hemoglobina. Ésta a su vez cumple con dos funciones importantes: transportar el oxígeno del aparato respiratorio a los tejidos periféricos y transportar desde estos el CO<sub>2</sub> hasta los pulmones para ser eliminado en el proceso ventilatorio.



La hemoglobina fija cuatro moléculas de oxígeno por tetrámero (uno por cada subunidad de grupo hemo) y sus curvas de saturación son sigmoideas. Por tanto la facilidad con la que el oxígeno se une a la hemoglobina depende de si hay otras moléculas de oxígeno presentes en el mismo tetrámero. Si existe oxígeno unido, la fijación de moléculas de oxígeno subsecuentes ocurre con mayor facilidad. La hemoglobina transporta  $\text{CO}_2$  de los tejidos a los pulmones para ser expulsado. La hemoglobina puede unir directamente al  $\text{CO}_2$  cuando cede su oxígeno y aproximadamente 15% del  $\text{CO}_2$  acarreado por la sangre es transportado así. El resto se transporta por la unión de dos protones por cada cuatro moléculas de oxígeno que pierden, protones que provienen de la disociación del ácido carbónico, mismos que se forman de la reacción del  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Quintanar y Calderón, 2006).

Los eritrocitos juegan un papel primordial en la toxicidad del plomo debido a que constituyen un medio de distribución al resto de órganos y tejidos, en la sangre el plomo se encuentra principalmente en eritrocitos, donde su concentración es 90 veces más alta que en el plasma. El plomo tiene un efecto desestabilizador en las membranas de los eritrocitos aumentando la tasa de hemólisis de los eritrocitos. El plomo es capaz de causar la destrucción de los eritrocitos a través de la formación de peróxidos de lípidos en las membranas celulares.

Solo a muy altas concentraciones puede el plomo modificar la unión del oxígeno, del  $\text{CO}_2$  o de los protones, por lo que estas funciones no son indicadores de toxicidad por plomo (Quintanar y Calderón, 2006).

### **1.8.1 Eritrocitos y plomo**

Una vez en la sangre, el plomo se incorpora a los eritrocitos, por ello se propone que su integración es a través de un sistema de transporte pasivo, en donde el plomo se transporta como un complejo aniónico  $\text{PbCO}_3^-$  a través del intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ; sin embargo la existencia de dicho compuesto no ha sido comprobada y se ha demostrado que al inhibir esta vía aún hay entrada significativa de plomo; también se ha demostrado que el plomo puede entrar al eritrocito a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Quintanar-Escorza et al., 2007). Una vez dentro del eritrocito el

plomo se une a las proteínas membranales y citoplasmáticas con muy alta afinidad al  $\text{Ca}^{2+}$  lo que genera concentraciones muy bajas de plomo libre en el citoplasma del eritrocito, que redundan en mayor facilidad de entrada y dificulta la salida, con el resultado de que más del 98% del plomo en la sangre se encuentre en el interior o unido al eritrocito.

La salida del plomo del eritrocito se realiza a través de un transporte activo a través de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ , la cual utiliza la energía de la ruptura del ATP. Esta bomba se llama ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de magnesio. El plomo comparte esta salida con el  $\text{Ca}^{2+}$  por lo que se hace muy eficiente su expulsión de los eritrocitos, esto a los primeros minutos del transporte de plomo al interior de los eritrocitos. Sin embargo, al paso del tiempo, la unión del plomo a las proteínas hacen que la bomba no logre detectar suficientes átomos de plomo libre para su salida, además se sabe que el plomo puede inhibir su propio sistema de salida, lo que provoca que al paso de los días el plomo tenga una acumulación efectiva en el interior del eritrocito.

### **1.8.2 Eritrocitos y daño oxidativo**

El plomo tiene un efecto desestabilizador en las membranas celulares, y en las células rojas de la sangre (RBC); el efecto disminuye la fluidez de la membrana celular y aumenta la tasa de hemólisis de eritrocitos. La hemólisis parece ser el resultado final de la peroxidación lipídica generada por ROS en la membrana de los glóbulos rojos. El plomo también puede unirse directamente a la fosfatidilcolina en la membrana de los glóbulos rojos, lo que lleva a una disminución en los niveles de fosfolípidos hipocrómica o anemia normocítica es un sello distintivo de la exposición al plomo; es el resultado de la generación de ROS y la posterior hemólisis de los eritrocitos. El plomo se considera, junto con la plata, mercurio y cobre, como un agente hemolítico fuerte, capaz de causar la destrucción de los eritrocitos a través de la formación de peróxidos de lípidos en las membranas celulares.

Además de la peroxidación de la membrana, la exposición al plomo causa la oxidación de la hemoglobina, que también puede provocar hemólisis. El mecanismo responsable de esta reacción es la inhibición inducida por el plomo de ALAD. ALAD

es la enzima más sensible a los efectos tóxicos del plomo - la formación del grupo hemo deprimido. Como resultado, los niveles elevados del sustrato ALA se encuentran tanto en la sangre y la orina de los sujetos expuestos al plomo.

Estos niveles elevados de ALA generan peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical superóxido ( $O_2^-$ ), y también interactúan con la oxihemoglobina, lo que resulta en la generación de radicales hidroxilos (OH), el más reactivo de los radicales libres. Como ALA es más oxidado, se convierte en ácido 4,5-dioxovalérico. La generación de este compuesto potencialmente genotóxico, es un posible mecanismo para la carcinogenicidad de DNA dependiente de plomo. Por el mismo mecanismo, el ALA puede ser responsable de la mayor frecuencia de cáncer de hígado en la enfermedad de porfiria aguda intermitente, otra condición en la que se producen niveles elevados de ALA.

El plomo en el caso de los eritrocitos humano puede causar daño oxidativo debido a la acumulación de ácido  $\sigma$ -aminoevulínico (ALA), hierro libre, hemo libre, característicos de la intoxicación con plomo los cuales además del  $O_2$  y hemoglobina pueden generar radicales libres. También se ha propuesto que el plomo es capaz de inhibir mecanismos antioxidantes, como las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (Quintanar y Calderón, 2009).

## **1.9 Eriptosis**

La apoptosis también llamada muerte celular programada, es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada; este fenómeno implica una programación celular, genéticamente regulada, para que la célula muera sin causar daño en la organización de los tejidos a que pertenece; es decir es un proceso ordenado, la célula muere sin causar una reacción inmunológica o inflamatoria que afecte a las células vecinas y con ello mantener la integridad del tejido (Quintanar y Calderón, 2006).

Hasta el año 2001, se pensaba que la apoptosis era un fenómeno de células nucleadas y que no podía encontrarse en células sin núcleo, como los eritrocitos.

Los trabajos de Berg y de Bratosin indicaron que la apoptosis se podía presentar en células sin núcleo, sus trabajos permitieron demostrar lo que posteriormente se llamaría eriptosis y que estos autores nombraron como “apoptosis de células anucleadas” o “muerte celular programada de los eritrocitos” (Berg et al., 2001).

### **1.9.1 Mecanismos involucrados en eriptosis**

Los principales mecanismos moleculares involucrados en el proceso de eriptosis son la disminución de la carga energética en la célula, el estrés osmótico y la disminución del poder reductor por medio de la relación NADP/NADPH y glutatión reducido/oxidado. Estas tres formas de estrés metabólico producen un incremento de calcio intracelular libre, aun cuando lo hacen por diferentes vías. En el caso del estrés energético, la reducción de ATP afecta la ATPasa de calcio, reduciendo su actividad y con ello la salida de calcio. En el caso de estrés oxidativo, la reducción de glutatión reducido incrementa la permeabilidad a calcio a través del canal de cationes, permitiendo una mayor entrada de este ión. En el estrés osmótico, activa a la fosfolipasa A<sub>2</sub>, que libera ácido araquidónico de la fosfocolina; este ácido es convertido en prostaglandina E<sub>2</sub> por ciclooxigenasa, la cual estimula al canal catiónico del que depende la entrada de calcio (Quintanar y Calderón, 2006).

El incremento de calcio intracelular libre activa el canal de potasio dependiente de calcio, que provoca la salida de potasio que a su vez induce la salida de agua y de cloro, generando la contracción del eritrocito. El incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular libre, la salida de potasio y la contracción celular provoca la externalización de FS. La acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, genera lisoderivado, el cual es transformado por una acetil transferasa en el factor de activación plaquetario (PAF) el cual es capaz de estimular a la esfingomielinasa, enzima que hidroliza a la esfingomielina y genera ceramida, la cual actúa a su vez como segundo mensajero para la señal de apoptosis, capaz de estimular la externalización de FS (Quintanar y Calderón, 2006).

## 1.10 Fosfolípidos

Los glicerofosfolípidos son lípidos de membrana en los que dos ácidos grasos están unidos por enlace éster al primer y segundo carbonos del glicerol y un grupo de cabeza muy polar o cargado está unido por enlace fosfodiéster al tercer carbono. Los glicerofosfolípidos derivados del ácido fosfatídico, se nombran según el alcohol polar en su grupo de cabeza. Ejemplos de estos son: fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfadiletanolamina. El alcohol polar puede estar cargado negativamente o ser neutro. Los ácidos grasos de los glicerofosfolípidos pueden variar. En general, contienen un ácido graso saturado en el primer carbono y un ácido graso insaturado en el segundo carbono.

### **1.10.1 Fosfolipasas**

Son enzimas cuya función es degradar fosfolípidos, Las fosfolipasas del tipo A, A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, hidrolizan los enlaces éster de glicerofosfolípidos en el primer y segundo carbono del glicerol, respectivamente. Cuando se ha eliminado uno de los ácidos grasos por una fosfolipasa del tipo A, el segundo ácido graso es eliminado de la molécula por una lisofosfolipasa.

La fosfolipasa A<sub>2</sub> es la enzima encargada de catalizar la hidrolisis del ácido graso de la posición sn-2 de los fosfolípidos de membrana, liberando lisofosfoderivado y un ácido graso. In vivo, los fosfolípidos frecuentemente tienen ácidos grasos poliinsaturados, que al ser liberados pueden ser metabolizados para formar eicosanoides y otros lípidos bioactivos. El lisofosfolípido puede tener un papel importante en diferentes procesos biológicos y también sirve como metabolito en la síntesis de fosfolípidos de membrana (Burke y Dennis, 2008).

### **1.11 Esfingolípidos**

Están formados por un grupo de cabeza polar y dos colas apolares, se diferencian de los glicerofosfolípidos en que no contienen glicerol. Los esfingolípidos están compuestos por una molécula de esfingosina, un amino-alcohol de cadena larga, o uno de sus derivados, una molécula de ácido graso de cadena larga y un grupo de cabeza polar por enlace fosfodiéster o por enlace glucosídico.

Cuando se une un ácido graso por enlace amida al segundo carbono de la esfingosina, se obtiene ceramida, la cual es la unidad estructural fundamental de los esfingolípidos.

Hay tres subclases de esfingolípidos, que difieren en sus grupos de cabeza: esfingomielinas, glucolípidos neutros y gangliósidos.

Las esfingomielinas contienen fosfocolina o fosfoetanolamina como grupo de cabeza polar. Las esfingomielinas se parecen a las fosfatidilcolinas en sus

propiedades general y en su estructura tridimensional y también por no tener carga neta en sus grupos de cabezas polares. Las esfingomielinas se encuentran en las membranas plasmáticas de las células animales. Son principalmente más abundantes en la mielina, una vaina que rodea y asila los axones de algunas neuronas.

### **1.11.1 Esfingomielinasa**

Esfingomielinasa: Son enzimas encargadas del hidrolisis de la esfingomielina en fosfocolina y ceramida.

De acuerdo al pH en el que tienen actividad las esfingomielinasas se clasifican en tres grupos: esfingomielinasas ácidas, de las cuales está la ubicua lisosomal y la que es dependiente de  $Zn^{2+}$ ; esfingomielinasas neutras, en las que se encuentran las que dependen de  $Mg^{2+}$  y las que son independientes; y esfingomielinasas alcalinas.

La deficiencia de la esfingomielinasa ácida afecta a pacientes de la enfermedad Niemann-Pick tipo A y B. La esfingomielinasa neutra, dependiente de magnesio, está asociada con la apoptosis y otros estímulos, causando la hidrolisis de la SM por lo tanto causando la generación de ceramida. Ceramidas sean visto envueltas en la regulación del crecimiento celular, la diferenciación, apoptosis y las respuestas inflamatorias.

## II. ANTECEDENTES

Trabajos previos de nuestro laboratorio han permitido caracterizar poblaciones de niños ambientalmente expuestos a plomo y trabajadores ocupacionalmente expuestos a plomo. En ambas poblaciones se ha definido algunos mecanismos fisiopatológicos de daño por plomo y se han encontrado mecanismos de respuesta a este tóxico (Calderón *et al*, 1996a; Calderón *et al*, 1996b, Aguilar *et al*, 2014).

Se ha demostrado que en eritrocitos humanos el calcio y el plomo comparten el mismo mecanismo de incorporación y que el plomo se acumula en el interior del eritrocito por su gran afinidad a proteínas, además de la reducción de la salida de plomo, que sucede por la ATPasa de calcio, el mismo mecanismo de salida del calcio (Quintanar, 2007; Calderón *et al*, 1999).

Se ha podido demostrar que en eritrocitos de humanos incubados con plomo existe un incremento de la concentración de calcio intracelular libre, dependiente del tiempo de incubación y de la concentración del plomo, con respecto a eritrocitos no incubados con plomo. Este incremento se pudo asociar con una mayor fragilidad osmótica, un incremento en la actividad de la proteasa calpaína, así como con importantes modificaciones en la forma de los eritrocitos (Quintanar, 2010; Calderón *et al*, 1999).

En eritrocitos de humanos incubados con plomo y en trabajadores expuestos a plomo se ha logrado observar que la intoxicación por plomo induce estrés oxidativo.

Recientemente se ha logrado asociar un incremento de la eriptosis a la intoxicación por plomo en trabajadores ocupacionalmente expuestos a plomo, intoxicación por plomo que también se caracterizó por la baja actividad de enzima a ALAD, lipoperoxidación, aumento en el calcio intracelular libre y fragilidad osmótica (Aguilar *et al*, 2014).

Se ha dilucidado parte de los mecanismos moleculares de señalización que participan en los fenómenos propuestos por Lang, sin embargo, es necesario



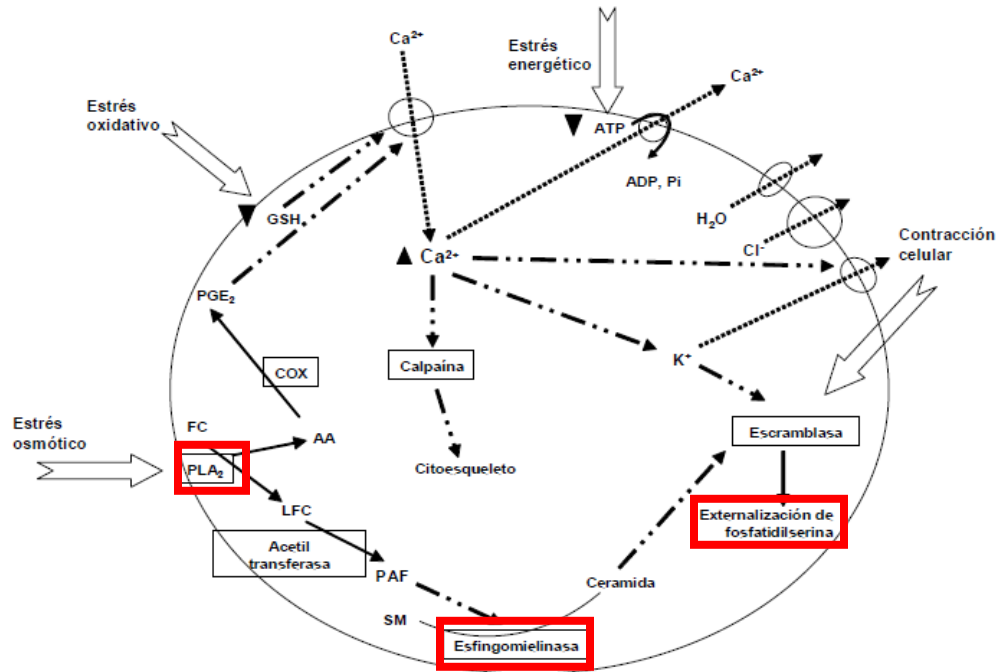
completar los otros mecanismos moleculares de señalización que también pueden participar en el proceso de eriptosis en pacientes intoxicados por plomo.

Se sabe que el choque hiperosmótico que lograron los autores, aumentando la osmolaridad de 300 mOsm a 850 mOsm incrementa la concentración de calcio intracelular libre y estimula la exposición de FS a la cara externa de la membrana del eritrocito. Inhibidores de PLA<sub>2</sub> como lo es la quinacrina y palmitoil-trifluormetilcetona interrumpen también la exposición de FS seguida del choque hiperosmótico (Lang *et al*, 2005).

El choque osmótico lleva a la formación de ceramidas en la superficie del eritrocito, experimentos *in vitro* revelan que ceramida-C6 así como el tratamiento con esfingomielinasa bacteriana disparan la eriptosis y este proceso puede ser inhibido por 3,4-dicloroisocumarina que es un inhibidor de la esfingomielinasa (Abed *et al*, 2012).

En células Molt-4 la esfingomielinasa neutra es activada por la reducción del GSH, de acuerdo con Liu y Hannun (1996), la esfingomielinasa neutra es inhibida por un aumento en la concentración de GSH y la inhibición es de acuerdo a la dosis, aun con concentraciones fisiológicas de 1-20 mM de GSH; también observaron en células Molt-4 que al agregar un inhibidor de la producción de GSH se incrementaba la hidrólisis de esfingomielina y la producción de ceramida. Por otro lado, Aguilar *et al* 2014 reportó que en trabajadores expuestos a plomo se encontró menor concentración de GSH con respecto al grupo no expuesto.

En la figura 2 se indica en cuadros de color rojo los mecanismos que se estudiarán en el presente trabajo (PLA<sub>2</sub>, esfingomielinasa y externalización de fosfatidilserina)



**Figura 2.** Mecanismos moleculares involucrados en eriptosis (Quintanar y Calderón, 2006).

### III. JUSTIFICACIÓN

México es el quinto país productor de plomo en el mundo, el 78% de su producción está destinada a la fabricación de baterías ácidas de plomo. En México las empresas dedicadas al reciclaje de plomo a partir de baterías ácidas están generando grandes cantidades de escoria de plomo, aumentando los riesgos por contaminación de plomo en trabajadores y en las comunidades aledañas a las plantas recicladoras. En un estudio realizado por Aguilar-Dorado et al., 2014 en un grupo de trabajadores expuestos en una empresa recicladora de acumuladores de plomo se encontró intoxicación por plomo por encima de la regulación permitida para trabajadores ocupacionalmente expuestos y daños moleculares y oxidantes; después se propuso la aplicación de medidas de seguridad e higiene en la empresa, así como el uso como suplemento de calcio y vitamina E en los trabajadores. Por ello, es importante determinar el grado de intoxicación y daño molecular y oxidante por plomo, de ese mismo grupo de trabajadores, mediante el diagnóstico integral de salud para observar daños crónicos por plomo y sus posibles efectos oxidantes cinco años después de la aplicación de medidas de seguridad e higiene, esperando encontrar niveles de Pb en sangre que estén dentro de los niveles permitidos por la NOM-047-SSA1-2011 y disminución de los efectos moleculares y oxidantes por plomo

La intoxicación con plomo es una seria enfermedad que forma parte de los mayores problemas de salud pública por exposición a tóxicos, en nuestro país. Este metal causa un amplio rango de disfunciones que impiden que los pacientes intoxicados puedan llevar una vida con una adecuada calidad.

Es necesario profundizar en las bases moleculares de la intoxicación por plomo; en los últimos años se ha demostrado que el eritrocito es capaz de presentar una muerte celular programada similar a la de las células nucleadas, que es conocida como eriptosis. En este caso buscando las señales intracelulares que se desarrollan para alcanzar eriptosis debido a la exposición a plomo. Completando o tratando de completar todos los procesos involucrados en el proceso de eriptosis que pudieran participar en los mecanismos fisiopatológicos inducidos en la intoxicación por plomo.

Estos estudios permitirán comprender las bases moleculares de los mecanismos por los cuales el daño oxidativo puede producir el proceso de eriptosis. Así como proponer posibles mecanismos que nos permita entender si es posible prevenir el proceso acelerado de la eriptosis en personas que están intoxicadas con plomo, con tratamientos alternos a la reducción de plomo en sangre por quelantes.

#### **IV. HIPÓTESIS**

En trabajadores expuestos a plomo el incremento de la actividad enzimática de fosfolipasa A<sub>2</sub> y de esfingomielinasa se encuentra asociada a estrés oxidativo y a un incremento de la eriptosis.

## V. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Analizar la actividad de la esfingomielinasa y la fosfolipasa A<sub>2</sub> y la concentración de ceramidas como mecanismos moleculares involucrados en la inducción de eriptosis en trabajadores expuestos a plomo y su relación con el proceso oxidativo.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinación de concentración de plomo en sangre por voltametría
- Determinación de la actividad de la enzima  $\delta$ -Aminolevulínico deshidratasa por espectrofotometría
- Determinación de lipoperoxidación en eritrocitos por colorimetría
- Determinación de capacidad antioxidante total en plasma,
- Analizar por citometría de flujo externalización de FS en eritrocitos
- Determinación de la actividad de PLA<sub>2</sub> en eritrocitos por fluorescencia
- Determinación de la actividad de esfingomielinasa en eritrocitos por fluorescencia.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **6.1 Obtención de muestras**

Las muestras de sangre fueron obtenidas del grupo de trabajadores de la fábrica de reciclaje de baterías de la Ciudad de León, Guanajuato, previa firma de consentimiento informado y con las condiciones éticas internacionales de acuerdo a los protocolos y declaraciones de Helsinki y los permisos de los comités de ética locales correspondientes se extrajeron con el trabajador en ayuno por venopunción, previa asepsia del brazo y empleando heparina como anticoagulante (12 U/ml de sangre).

### **6.2 Determinación de concentración de plomo en sangre**

En una solución de cloruro de cromo 1.07%, acetato de cadmio 1.43% y ion mercurio 0.0028% (la cual controla el pH y suprime a la formación de espuma) se adicionaron 100 µl de sangre heparinizada y homogeneizada, manteniéndose en reposo por una hora, con esto se provoca la hemolisis y la lisis de sus eritrocitos y sus componentes moleculares, dejando soluble el plomo que contenía. La determinación de plomo en sangre se llevó a cabo en un analizador de plomo modelo 3010 B (marca ESA), previamente calibrado con estándares de concentraciones conocidas, se debe tener un potencial negativo para que los iones de plomo en solución reaccionen sobre el electrodo de mercurio. Posteriormente durante 1 min el potencial se hizo menos negativo lo cual hizo que el plomo se ionizara e indujera una corriente, el voltaje obtenido es directamente proporcional a la concentración de plomo de la muestra. Los valores que determina el voltímetro se reportan en µg/dl. De acuerdo al método estandarizado por Calderón y col. (Calderón et al., 1996).

### **6.3 Determinación de la enzima δ-ALA-D**

La determinación de esta enzima se basa en la formación de porfobilinógeno a partir de ácido δ-aminolevulínico (δ-ALA). El porfobilinógeno formado en 60 min reacciona con el reactivo de Erlich y el producto de la reacción se medirá con un

espectrofotómetro. Una alícuota de 200 µl de sangre con anticoagulante se hemolizó con 1.45 ml de agua destilada y desionizada, posteriormente se le adicionaron 1 ml de ácido δ-aminolevulínico (δ-ALA) 0.01M a un pH de 6.5 recientemente preparado y se incubó a 37°C durante una hora. La reacción se detuvo añadiendo 1 ml ácido tricloracético (TCA) al 10 % y 50 µL de una solución saturada de sulfato de cobre. La muestra se centrifugó a 1100 x g por 5 min y 1 ml del sobrenadante se pasó a un tubo que contenía el reactivo de Erlich, preparado en el laboratorio, se midió la absorbancia a 555 nm de un espectrómetro UV/VIS modelo 30 (Beckman-USA). El equipo se ajustó a cero con un blanco que sustituyó la sangre por agua destilada. Los resultados se expresan en nmolas de porfobilinógeno/h/ml de paquete globular. Los valores de referencia que han sido reportados van de 650 a 1400 nmolas de porfobilinógeno/h/ml de paquete globular (Cardalda et al., 1997; Santos et al., 1998).

#### **6.4 Determinación de lipoperoxidación en eritrocitos por colorimetría**

El método se fundamenta en que uno de los productos terminales de la peroxidación de lípidos, el malonildialdehído (MDA), de tal manera que la cuantificación del MDA es un índice del grado de peroxidación lipídica. Dos moléculas de ácido tiobarbitúrico reaccionan con una de MDA para formar un pigmento rojo, el cual tiene una absorbancia máxima de 532 nm. Es muy importante mencionar que la determinación de TBAR determina productos de la lipoperoxidación que incluye aldehídos y cetonas; sin embargo uno de los principales productos es el MDA por esta razón la determinación tiene como estándar este compuesto (Jain et al., 1989). A partir de la muestra sanguínea heparinizada se obtuvo el paquete globular, centrifugando a 4500 xg por 8 minutos con una solución salina isotónica. El paquete celular se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, butirihidroxitolueno 0.01 M y ácido tricloracético al 30%. La mezcla se incubó a 4°C por 2.5 h. Al terminar se centrifugó a 5000 x g por 15 min. Se colectó el sobrenadante el cual contenía el MDA y se adicionó EDTA 0.1 mM y TCA al 1 %. La mezcla se incubó en un baño maría a temperatura de ebullición durante 15 min. El complejo colorido se determinó en un espectrofotómetro modelo 30 (Beckman-USA) a 532



nm. El equipo se ajustó a cero con un blanco que se prepara en paralelo, sustituyendo la sangre con solución amortiguadora de fosfatos.

### **5.5 Evaluación de capacidad antioxidante en plasma**

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante total se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o de la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en el tiempo de evaluación, en la técnica instrumental utilizada, la sensibilidad y en las interacciones de la muestra con el medio de reacción. (Quintanar y Calderón, 2009).

La técnica registrada por Miller y otros, 1993, se basa en el principio de la formación del radical catión 2,2'-azino-di(3-etilbenzotiazohín sulfonato (ABTS<sup>+</sup>) debido a la acción de la metamioglobina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este radical presenta una coloración verde azulada que se mide a 600 nm. La presencia de antioxidante en la mezcla produce una supresión de la formación del radical y por ende de la coloración, siendo la misma proporcional a la actividad antioxidante. El método utiliza el Trolox (derivado sintético de la vitamina E) como patrón. Las muestras no deben sobrepasar los 2,5 mmoles /L para su medición (RE, 1999).

### **5.6 Análisis por citometría de flujo de la externalización de FS en eritrocitos**

La determinación de FS se llevó a cabo con el uso de anexinas; se sugiere que las anexinas son un método viable para observar a las células sin tener que dañar a la membrana, las anexinas tienen alta afinidad por fosfolípidos de carga negativa y ya que no es permeable a la célula y que puede ser vinculada al indicador fluorescente fluoresceína se ha utilizado para poder identificar a la FS que se encuentra en la cara externa de la membrana. El procedimiento fue el siguiente: Se ajustó la concentración celular a  $4 \times 10^5$  células/ml, se alicuotaron muestras control y muestras

problema, a estas últimas se les añadió 10  $\mu$ L de AV-FITC de la marca ZYMED se dejaron reposar por 10 min y posteriormente se añadió el buffer de unión (Hepes 10mM, NaCl 140 mM y  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM a pH 7.5) se centrifugó a 3000 rpm durante 1 min se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 190  $\mu$ L de buffer de unión, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo. En el citómetro también utilizamos la técnica de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) que proporciona datos tales como el tamaño relativo de la célula, granularidad o complejidad interna y la intensidad relativa de fluorescencia. Para llevar a cabo lo anterior, el aparato necesita de un sistema combinado de flujo, óptica y electrónica. El sistema de flujo introduce y restringe a las células para su análisis individual, el sistema óptico excita la muestra y colecta las señales de luz provenientes de la misma y el sistema electrónico convierte la señal óptica en una señal electrónica y la digitaliza para el análisis en computadora. El tratamiento de las células es exactamente el mismo para determinar ANEXINA V (Bentzen et al., 2007).

### **5.7 Determinación de la actividad de PLA<sub>2</sub> por fluorescencia**

Se usó el sustrato bis-BODYPY FL C<sub>11</sub>-PC el cual por acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> salibera un compuesto fluorescente. La actividad de PLA<sub>2</sub> se monitorea por la generación de un producto fluorescente con longitud de onda de excitación/emisión de 515/575 nm

### **5.8 Determinación de la actividad de esfingomielinasa por fluorescencia**

Se utilizo un método basado en el uso de 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (Amplex Red), una sonda sensible para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En primer lugar, esfingomielinasa hidroliza la esfingomielina para producir ceramida y fosforilcolina. Después por acción de la fosfatasa alcalina, que hidroliza la fosforilcolina, la colina se oxida por acción de la colina oxidasa a betaína y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en presencia de una peroxidasa, reacciona con Amplex Red para generar un producto altamente fluorescente con longitud de onda de excitación/emisión de 560/590 nm.

## **5.9 Análisis estadístico de los datos**

El análisis estadístico de este estudio se realizó con el paquete estadístico Graph Pad Prims versión 5 (California incorporation). Se realizó una prueba de t-student para muestras independientes con un nivel de significancia de  $p \leq 0.001$ .

## **VII. RESULTADOS**

### **7.1 Análisis demográfico**

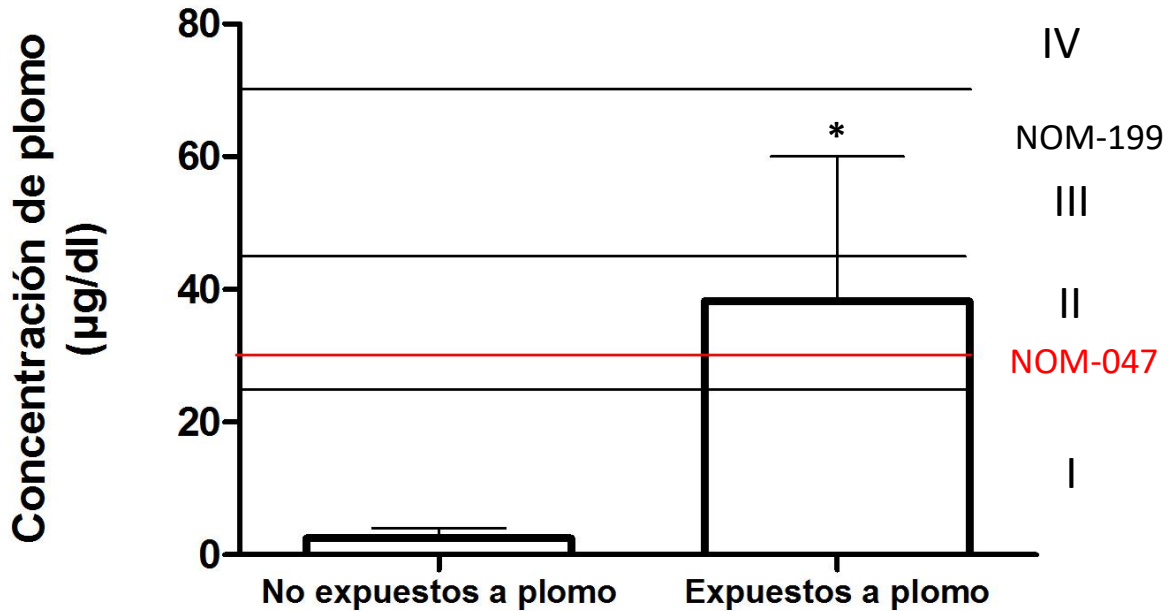
Para el grupo expuesto a plomo se tomaron 30 muestras sanguíneas las cuales se extrajeron por venopunción a los trabajadores de una recicladora de baterías. La edad de los participantes vario entre 18 y 70 años, la media y desviación estándar fue de  $38.6 \pm 12.2$  años, respectivamente. La mayoría de los trabajadores fue del sexo masculino y el 27.6% fueron del sexo femenino. Los trabajadores participantes tienen un tiempo de exposición al plomo de entre 1 a 17 años, la media y la desviación estándar del tiempo de exposición al plomo fue de  $6.9 \pm 4.9$  años, respectivamente. El 37.9% de los participantes había estado trabajando durante 5 años o menos, el 27.6% de 5 a 10 años y el 34.5% había estado trabajando por más de 10 años. De los trabajadores participantes, el 21% laboran en la administración, cocina, laboratorio y control ambiental; el 17% en supervisión, almacén y reparación de maquinaria; el 45% en el área de oxidación, horno, crisol, patio y mantenimiento, y el 17% en producción, limpieza, vigilancia y transporte.

Para el grupo no expuesto a plomo, el cual se usó como control se tomaron 27 muestras sanguíneas a individuos que no tuvieran antecedentes de exposición al plomo ni ocupacional ni cotidianamente, además que fueran clínicamente sanos. La edad de los participantes varió de 23 a 37 años; del total de participantes no expuestos, el 51.9% son del sexo masculino y 48.1% del sexo femenino.

### **7.2 Concentración de plomo en sangre**

La concentración de plomo en sangre es un parámetro utilizado para diagnosticar intoxicación por plomo. En la figura 3 se muestra la media y la desviación estándar de la concentración de plomo en sangre del grupo no expuesto y del grupo expuesto a plomo. La línea roja representa el valor de referencia establecido en la norma oficial mexicana dirigida a la población ocupacionalmente expuesta a plomo (NOM-047-SSA1-2011, 2011). Las líneas negras representan los niveles de plomo en sangre de las categorías establecidos por la norma oficial mexicana dirigida a la

población expuesta no ocupacionalmente (NOM-199-SSA1-2000, 2000). Se observó diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.



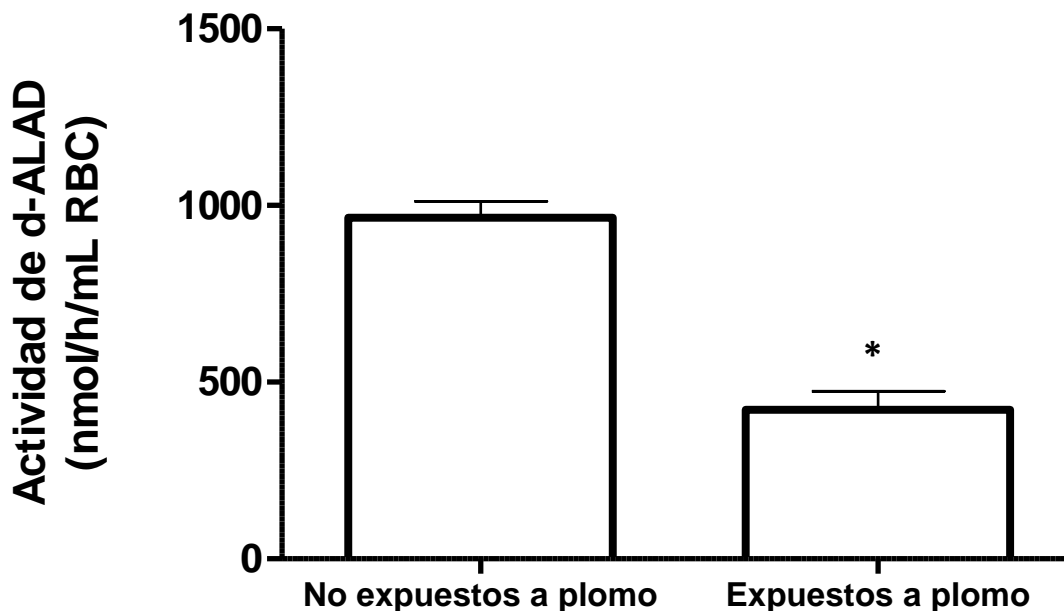
**Figura 3.** Concentración de plomo en sangre, determinados por voltametría, en grupo no expuesto a plomo (n=27) y grupo expuesto a plomo (n=30). Se presenta media y desviación estándar. \*diferencia estadísticamente significativa (P<0.0001). Línea roja (valor de referencia NOM-047-SSA1-2011). Líneas negras (Categorías I, II, III y IV NOM-199-SSA1-2000)

El grupo de trabajadores expuestos a plomo presenta una concentración de plomo en sangre de  $38.2 \pm 4.0 \mu\text{g/dL}$ , este valor se encuentra fuera de los límites establecidos por la norma oficial mexicana NOM-047-SSA1-2011 ( $30 \mu\text{g/dL}$ ) y es 50% más alto que el valor permitido por la norma oficial mexicana NOM-199-SSA1-2000 ( $25 \mu\text{g/dL}$ ). Del grupo expuesto a plomo el 33% están en la categoría I ( $<25 \mu\text{g/dL}$ ), el 20% en la categoría II ( $25-44 \mu\text{g/dL}$ ) y el 47% en las categorías III ( $45-69 \mu\text{g/dL}$ ) y IV ( $>70 \mu\text{g/dL}$ ), estos valores sugieren que hay exposición y absorción de plomo en los trabajadores del grupo expuesto a plomo. La concentración de plomo en sangre del grupo expuesto a plomo fue 15.3 veces más alta que en la del grupo

no expuesto a plomo ( $2.5 \pm 0.29 \mu\text{g/dL}$ ), valor muy por debajo de los niveles establecidos por las normas antes mencionadas.

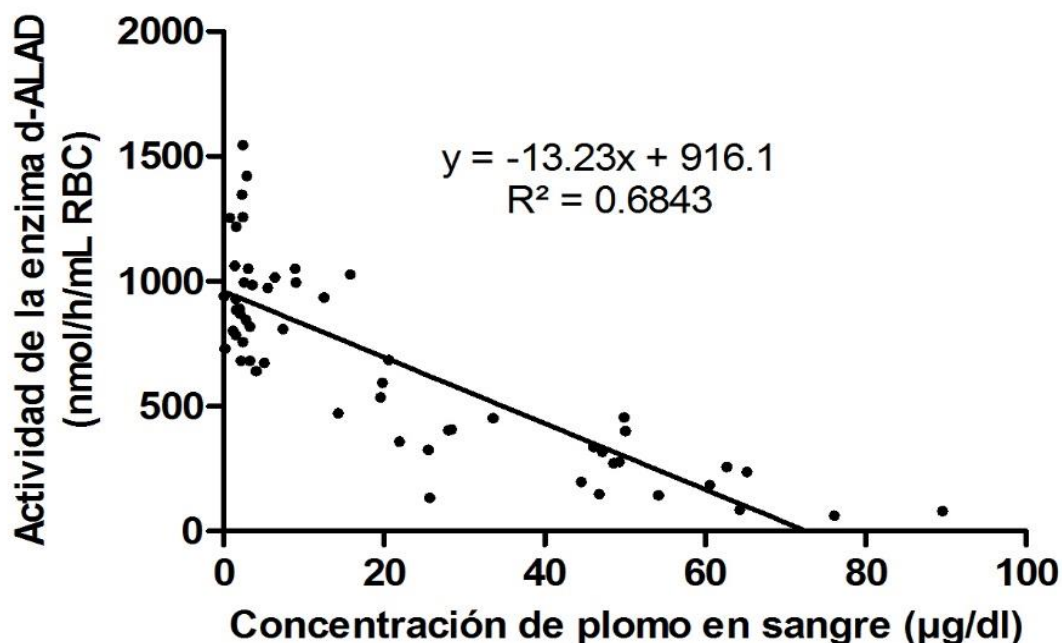
### 7.3 Determinación de la actividad de la enzima $\delta$ -ALAD

La intoxicación por plomo es caracterizada por la inhibición de la actividad de la enzima ALA-D. En la figura 4 se compara la actividad de la enzima  $\delta$ -ALAD entre el grupo no expuesto a plomo y el grupo expuesto a plomo, se presenta la media y la desviación estándar. Se observa que el grupo expuesto a plomo presenta el 43.7% menos de actividad de la enzima en comparación con el grupo no expuesto a plomo ( $422 \pm 53$  contra  $965 \pm 46$  nmol PBG/h/mL) con esto se demuestra que efectivamente hay una intoxicación por plomo. La diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa.



**Figura 4.** Determinación de la actividad de la enzima d-ALAD, determinados por espectrofotometría, en grupo no expuesto a plomo y expuesto a plomo. Se presenta media y desviación estándar. \*diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ).

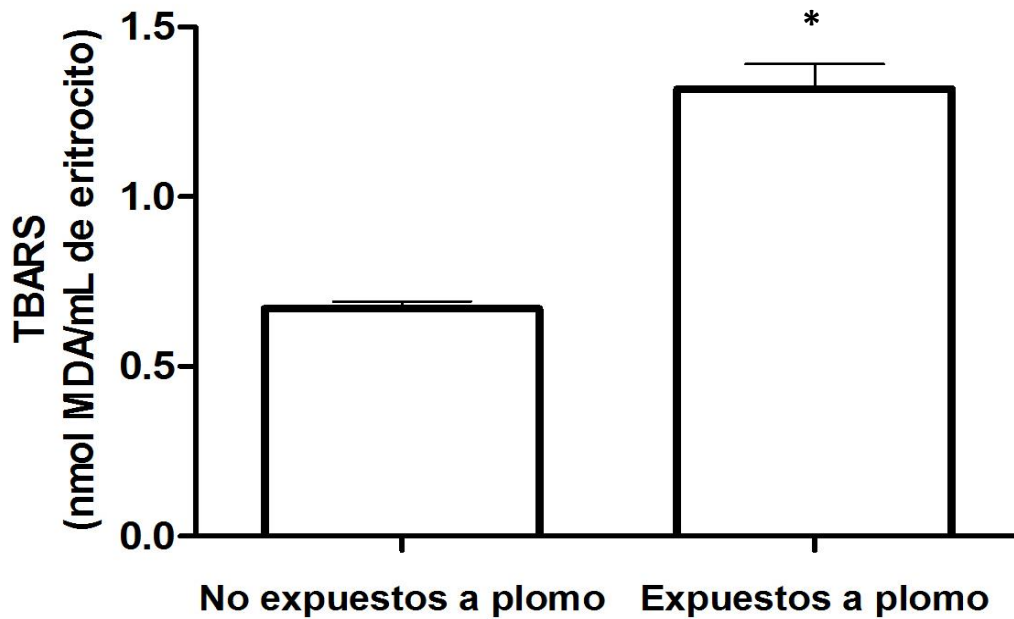
Como se observa en la figura 5, se encontró una correlación negativa ( $R^2 = 0.6843$ ) entre la concentración de plomo en sangre y la actividad de la enzima ALA-D, lo que indica que a mayor concentración de plomo en sangre se presenta una menor actividad de la enzima.



**Figura 5.** Correlación entre concentración de plomo en sangre y actividad de la enzima d-ALAD de grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo. Se presenta la ecuación de la recta y coeficiente de correlación. Correlación significativa ( $P < 0.0001$ )

#### 7.4 Determinación de lipoperoxidación

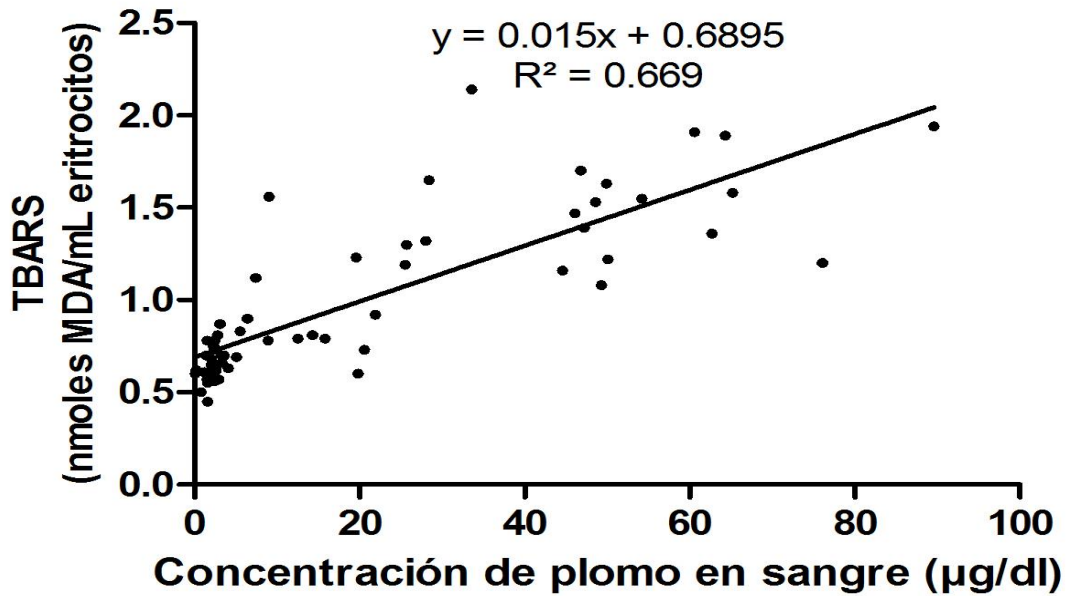
La medición de las especies reactivas al ácido tiobarbiturico (malonaldehído) es usado para medir el nivel de lipoperoxidación, este es un parámetro indirecto en el diagnóstico de la intoxicación de plomo. El nivel de lipoperoxidación en los dos grupos estudiados se muestra en la figura 6, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. El grupo de trabajadores expuestos a plomo presenta una lipoperoxidación 97% mayor que el grupo no expuesto a plomo ( $1.3 \pm 0.07$  contra  $0.7 \pm 0.02$  nmol MDA/mL de eritrocito, expuestos a plomo contra no expuestos a plomo, respectivamente). Los datos obtenidos indican que hay un daño oxidativo inducido por la exposición a plomo.



**Figura 6.** Concentración de especies reactivas a ácido tiobarbitúrico en eritrocitos, determinados por espectrofotometría, en grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo. Se presenta media y desviación estándar. \*diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ).

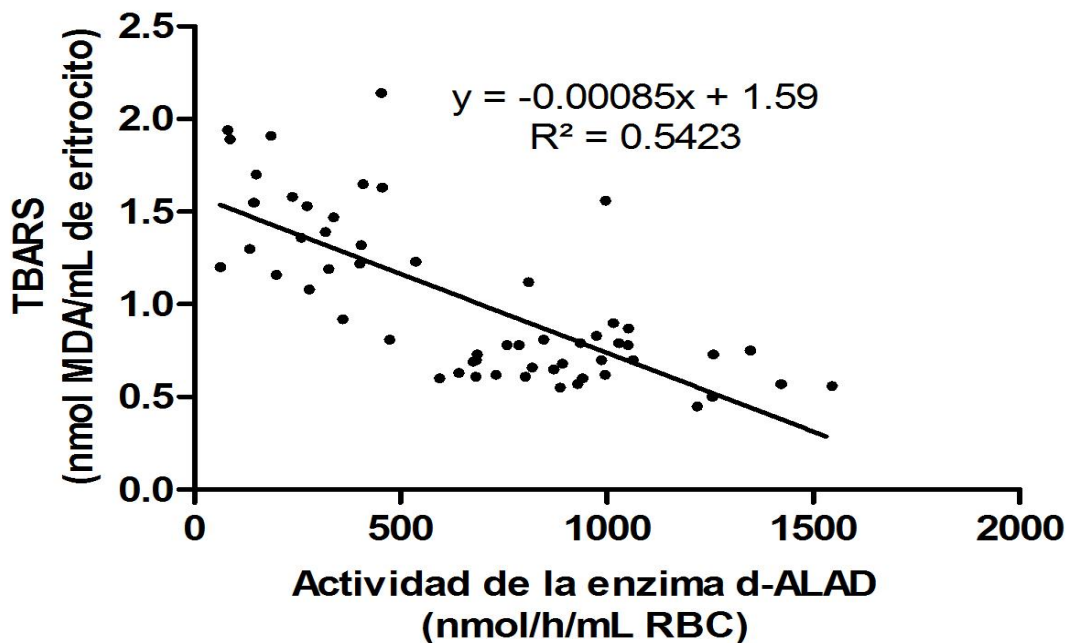
En la figura 7 se muestra una correlación positiva ( $R^2 = 0.669$ ) entre la concentración de plomo en sangre y la concentración de especies reactivas a ácido tiobarbitúrico, es decir, que a mayor concentración de plomo en sangre se presenta mayor lipoperoxidación en eritrocitos.





**Figura 7.** Correlación entre concentración de plomo en sangre y concentración de especies reactivas a ácido tiobarbitúrico en eritrocitos de grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo. Se presenta la ecuación de la recta y coeficiente de correlación. Correlación significativa ( $P < 0.0001$ )

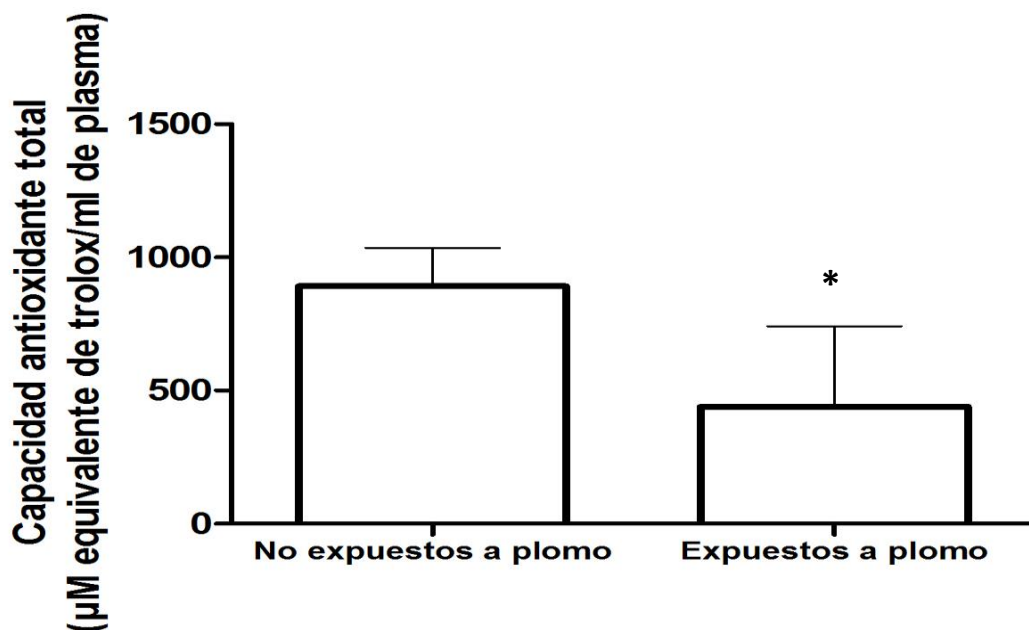
En la figura 8 se muestra una correlación negativa ( $R^2 = 0.5423$ ) entre la actividad de la enzima ALAD y la concentración de especies reactivas a ácido tiobarbitúrico, de acuerdo con lo anterior a menor actividad de la enzima ALAD se presenta mayor lipoperoxidación en eritrocitos.



**Figura 8.** Correlación entre actividad de la enzima d-ALAD y concentración de especies reactivas a ácido tiobarbitúrico en eritrocitos de grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo. Se presenta la ecuación de la recta y coeficiente de correlación. Correlación significativa ( $P < 0.0001$ ).

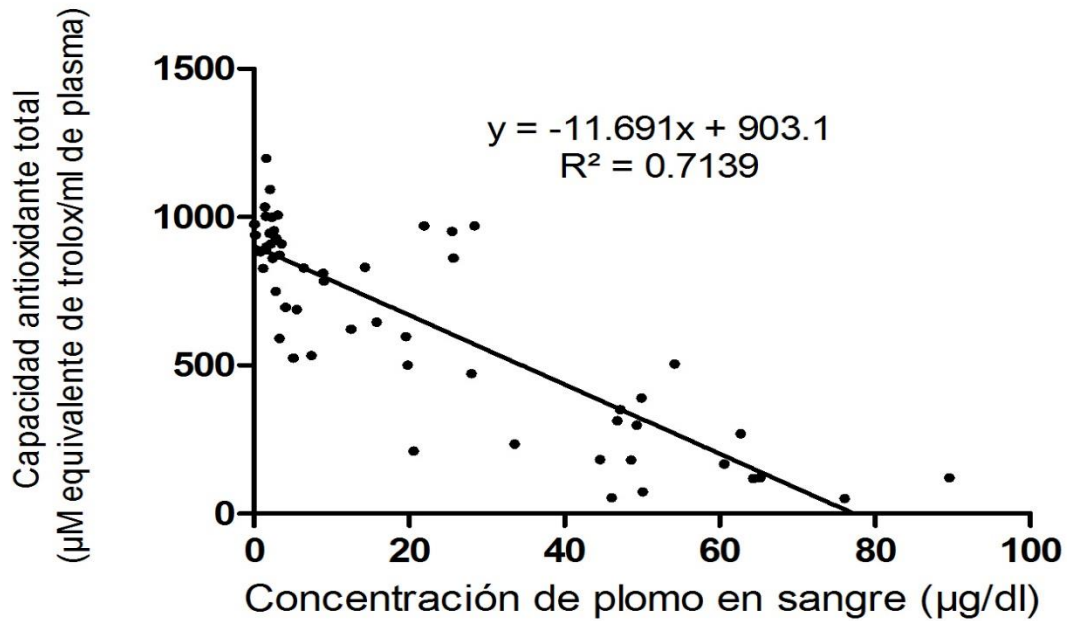
### 7.5 Determinación de capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total es una técnica que se utiliza para determinar el estado del conjunto de elementos del mecanismo de defensa antioxidante. En la figura 9 se puede observar que se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, donde el grupo expuesto a plomo presentó una capacidad antioxidante total dos veces menor que el grupo no expuesto a plomo ( $440 \pm 55$  contra  $892 \pm 28$ ).



**Figura 9.** Determinación de capacidad antioxidante total en plasma, determinados por espectrofotometría, en grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo. Se presenta media y desviación estándar. \*diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ).

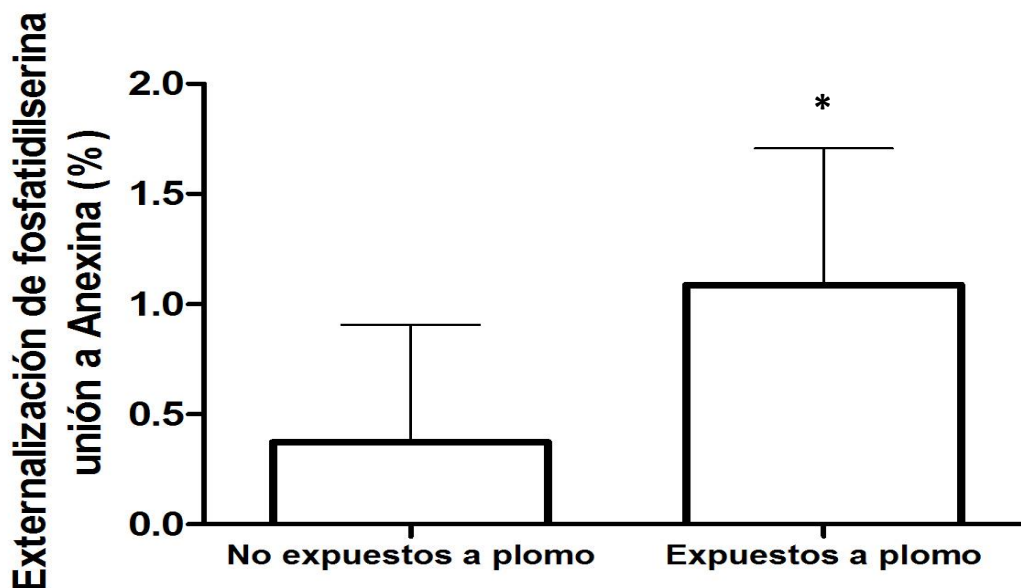
En la figura 10 se muestra una correlación negativa ( $R^2 = 0.7139$ ) entre la concentración de plomo en sangre y la capacidad antioxidante total, de acuerdo con lo anterior a mayor concentración de plomo en sangre se presenta menor capacidad antioxidante total.



**Figura 10.** Correlación entre concentración de plomo en sangre y capacidad antioxidante total en plasma grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo. Se presenta la ecuación de la recta y coeficiente de correlación. Correlación significativa ( $P < 0.0001$ )

### 7.6 Externalización de fosfatidilserina

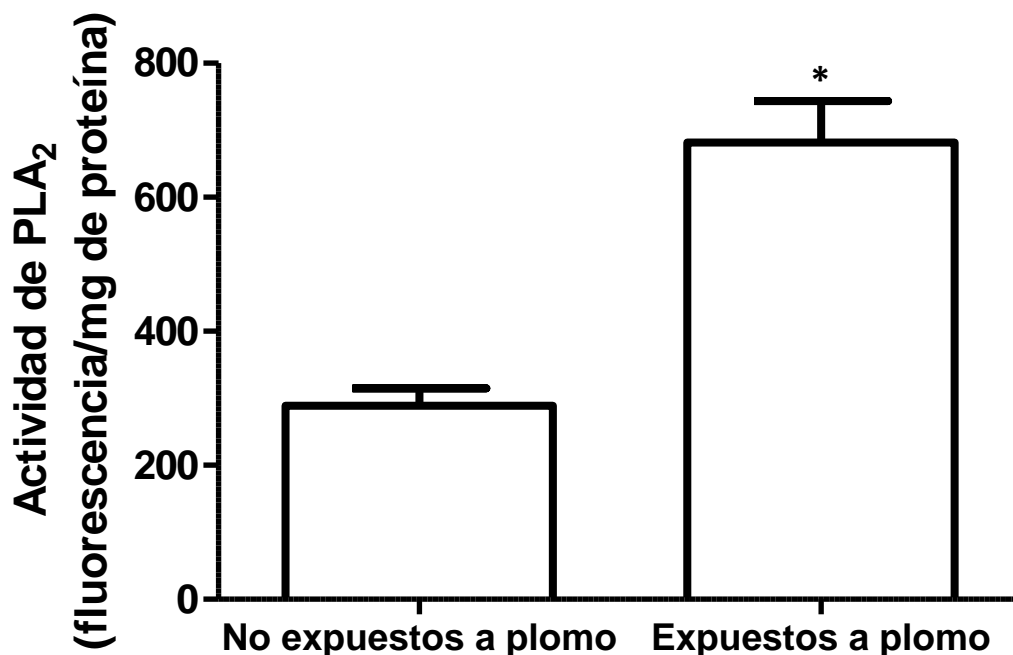
La externalización de fosfatidilserina indica que los eritrocitos están en proceso de eritosis. Como se muestra en la figura 11 se encontró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo no expuesto a plomo y el grupo expuesto a plomo en el porcentaje de externalización de fosfatidilserina. Donde el grupo expuesto a plomo ( $1.09 \pm 0.12$ ) presentó un incremento del 1.9 veces del proceso eritosis en comparación con el grupo no expuesto a plomo ( $0.37 \pm 0.1$ ).



**Figura 11.** Externalización de fosfatidilserina en eritrocitos, determinados por la unión a Anexina V (anexinaV-FITC) por citometría de flujo, en grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo. Se presenta media y desviación estándar. \*diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ).

### 7.7 Determinación de la actividad de la enzima PLA<sub>2</sub>

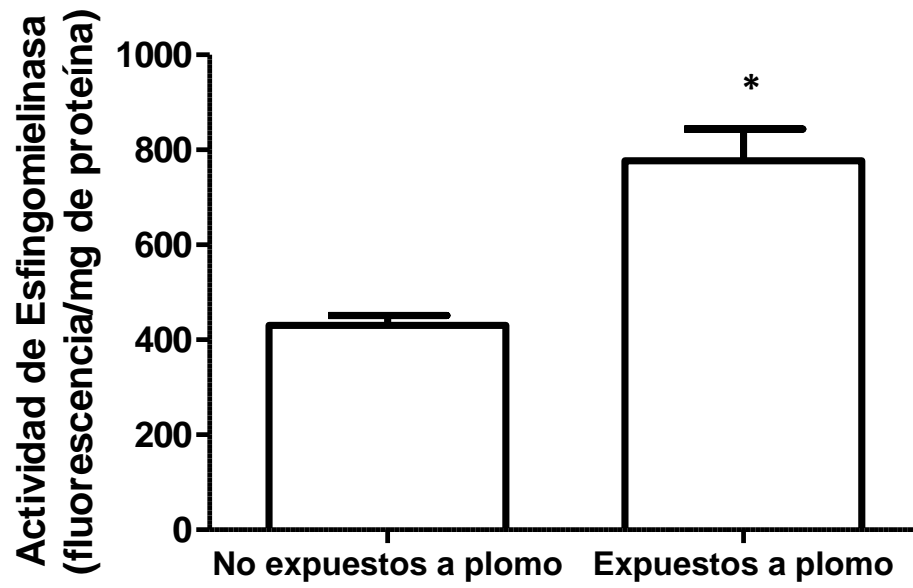
En la figura 12 se observa la comparación de la actividad de la enzima PLA<sub>2</sub> entre el grupo no expuesto a plomo y el grupo expuesto a plomo, se presenta media y desviación estándar. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, el grupo expuesto a plomo presentó una actividad 1.4 veces más alta con respecto al grupo no expuesto a plomo ( $681 \pm 62$  contra  $289 \pm 26$ ).



**Figura 12.** Actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> en eritrocitos, determinada por la fluorescencia del reactivo Red/Green BODIPY PC-A2, en grupo no expuesto a plomo y grupo expuesto a plomo. Se presenta media y desviación estándar. \* diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

### 7.8 Determinación de la actividad de la enzima esfingomielinasa

En la figura 13 se observa la comparación de la actividad de la enzima esfingomielinasa entre el grupo no expuesto a plomo y el grupo expuesto a plomo, se presenta media y desviación estándar. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, el grupo expuesto a plomo presentó una actividad 80 % más alta con respecto al grupo no expuesto a plomo (778 ± 67 contra 431 ± 21).



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

## VIII. DISCUSIÓN

### 8.1 Intoxicación por plomo en trabajadores expuestos

Los individuos en el grupo expuesto a plomo son trabajadores de una recicladora de baterías de plomo ácido. Son de diferentes áreas de trabajo y con diferentes tiempos de exposición, no han estado bajo tratamiento antioxidante ni de quelantes 4 meses antes del estudio. El grupo no expuesto a plomo consta de individuos que no tienen antecedentes de haber estado expuestos a plomo ocupacionalmente ni en la vida diaria, y son clínicamente sanos. Por lo que ambos grupos pueden ser utilizados para comparaciones en el estudio.

Nuestro laboratorio ha trabajado con anterioridad con el grupo de trabajadores expuesto a plomo. En el 2006, Aguilar y colaboradores encontraron altos niveles de plomo en sangre demostrando que se carecía de medidas de seguridad e higiene. A partir de dicho estudio se aplicaron medidas de seguridad e higiene a los trabajadores de la misma empresa, así como tratamiento con antioxidantes.

En México la NOM-199-SSA1-2000 de Salud Ambiental, determina los niveles de plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente y en los Estados Unidos de Norteamérica, los Centros de Control de las Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) mencionan que los niveles sanguíneos de plomo  $\geq 10 \mu\text{g/dL}$  deben provocar algunas medidas de prevención en la comunidad (Cabrera y Cureño, 2006).

El principal parámetro utilizado para diagnosticar intoxicación por plomo es la determinación de concentración de plomo en sangre, en el presente estudio se encontró una menor concentración ( $38.2 \mu\text{g/dL}$ ) de plomo en comparación con la encontrada en el 2014 ( $64.8 \mu\text{g/dL}$ ), a pesar que los niveles de plomo en sangre disminuyeron considerablemente continúan fuera del límite establecido por la normal oficial mexicana NOM-047-SSA1-2011, la cual indica que la concentración de plomo en sangre permisible en población ocupacionalmente expuesta es de  $30 \mu\text{g/dL}$ . De acuerdo a lo anterior se comprueba que efectivamente hay intoxicación por plomo en trabajadores expuestos a plomo, mientras que el grupo no expuesto



a plomo se mantuvo dentro los límites permisibles de concentración por plomo en sangre ( $<10 \mu\text{g/dL}$ ), esto muestra que ambos grupos pueden ser usados para ser comparados, ya que el grupo expuesto a plomo presento una concentración de plomo en sangre 14 veces mayor que el grupo no expuesto a plomo.

El sistema hematológico se ha propuesto como el blanco principal de la toxicidad del plomo, el efecto del plomo en este sistema inhibe la síntesis de hemoglobina. ALA-D es la enzima más sensible a los efectos tóxicos del plomo, corresponde al principal sitio de unión del plomo, es la segunda enzima en la ruta de la biosíntesis del grupo hemo de los eritrocitos y cataliza la condensación de dos moléculas de ácido aminolevulinico a un porfobilinógeno. El plomo debido a su afinidad por los grupos SH, compite con el zinc e inhibe la actividad de ALAD, la cual posee grupos SH, que son esenciales para su actividad. La proteína ALAD 2 es más sensible al plomo que la proteína ALAD 1. Esta interacción del plomo con la enzima altera la toxico-cinética del plomo (Kamel et al., 2003), su distribución y por lo tanto su toxicidad (Hu et al., 2001).

Los resultados obtenidos de ALAD mostraron que hay menor actividad en los trabajadores expuestos a plomo (43.7%) comparado con el grupo no expuesto a plomo y esto es un indicador de que no hay solo una exposición a plomo sino también una intoxicación. El porcentaje de inhibición de la enzima fue menor en comparación con el obtenido en un estudio anterior, donde se encontró un 88.3% menos actividad en los trabajadores expuestos a plomo en comparación con el grupo no expuesto a plomo (Aguilar et al, 2014).

Aguilar y colaboradores (2014) no encontraron correlación significativa entre la concentración de plomo en sangre y la actividad de ALAD, probablemente debido a que las concentraciones de plomo en sangre que se encontraron fueron muy altas. En el presente trabajo se obtuvo una correlación significativa entre ambos parámetros, como ya se había observado en estudios anteriores (Gurer-Orhan, *et al*, 2004). Como era de esperarse se encontró una correlación negativa, es decir que a mayor concentración de plomo en sangre se presenta menos actividad de ALAD.

## **8.2 Daño oxidativo en trabajadores expuestos a plomo**

Otro parámetro que se ha encontrado alterado en los pacientes que presentan intoxicación por plomo es la lipoperoxidación, el cual es un indicador de daño oxidativo, el grupo de trabajadores expuestos a plomo presento el doble de la lipoperoxidación con respecto al grupo no expuesto, lo cual confirma que en la intoxicación por plomo se promueve el daño oxidativo y que los trabajadores se encuentran con un insulto oxidativo de importancia.

Varios factores como altas concentraciones de oxígeno, la capacidad de la hemoglobina de auto-oxidarse, componentes de la membrana vulnerables a la peroxidación lipídica y la capacidad limitada para reparar los componentes dañados hacen que los eritrocitos sean sensibles al daño oxidativo.

La inhibición de ALAD resulta en la acumulación de ALA y se ha demostrado que el ALA acumulado está involucrado en el daño oxidativo inducido por plomo, debido a que promueve la formación de especies reactivas debido a su autooxidación. Los niveles elevados de ALA se han propuesto como fuente de formación de especies reactivas de oxígeno durante el estrés oxidativo inducido por plomo. ya que al inhibir ALAD se acumula ALA. Se ha demostrado que el ALA acumulado experimenta una autooxidación catalizada por el metal que da lugar a la formación de superóxido y peróxido de hidrogeno (Gurer-Orhan, *et al*, 2004).

El plomo además de promover un ambiente de oxidación, generando radicales libres se ha propuesto que es capaz de inhibir enzimas antioxidantes, dejando al organismo con una línea de defensas antioxidantes que no es capaz de sobrellevar el insulto oxidativo (Rendón *et al*, 2007, Quintanar *et al*, 2007; Quintanar *et al*, 2010).

Adicionalmente uno de los efectos de la exposición al plomo está en el metabolismo del glutatión. El glutatión es un tripéptido formado por cisteína más de 90 por ciento del azufre en el cuerpo humano se encuentra en el glutatión. Además de actuar como un antioxidante importante para reducir los radicales libres, el glutatión es un sustrato responsable del metabolismo de fármacos y toxinas específicas a través de la conjugación en el hígado. El complejo sulfhidrilo del glutatión también se une directamente a metales tóxicos que tienen una alta afinidad por los grupos

sulfhidrilo, como el caso del plomo. Además, el glutatión participa como co-sustrato de enzimas antioxidantes (Patrick, 2006).

Se ha propuesto que el plomo es capaz tanto de elevar y suprimir los niveles sanguíneos de las enzimas antioxidantes y Aguilar et al (2014) encontraron la relación de GSH/GSSG disminuida en trabajadores expuestos a plomo al compararlas con el grupo no expuesto a plomo.

La correlación que se obtuvo de la concentración de plomo en sangre con la concentración de MDA en eritrocitos, indica que a mayor concentración de plomo en sangre se presenta mayor daño oxidativo en eritrocitos. Además, se encontró correlación negativa entre la actividad de ALAD y concentración de MDA en eritrocitos, con lo que se deduce que a menor actividad de ALAD se presentará mayor concentración de MDA en eritrocitos, esto se puede explicar con lo que se ha mencionado anteriormente, sobre todo con el incremento esperado de ALA.

Con respecto a la respuesta antioxidante, grupo de trabajadores expuestos a plomo presento una notable disminución (50%) de la capacidad antioxidante total en comparación con el grupo no expuesto a plomo, con lo que se deduce que los mecanismos de defensa antioxidante han sido alterados por la exposición a plomo y con esto se promueve el daño oxidativo, siendo congruentes con la posibilidad, no estudiada en el presente trabajo, de la reducción de la actividad de las enzimas y de la concentración de glutatión reducido.

Se encontró correlación negativa entre la concentración de plomo en sangre y la capacidad antioxidante total, indicando que a mayor concentración de plomo en sangre es posible proponer una reducción de los mecanismos de defensa antioxidante.

### **8.3 Incremento de la eriptosis en trabajadores expuestos a plomo.**

Un incremento del proceso eriptótico se observó por primera vez por Aguilar *et al.* (2014) *in vivo* en trabajadores expuestos a plomo en el grupo de trabajadores que se analizó en el presente trabajo.

Como ya se ha mencionado la eriptosis es un proceso fisiológico encargado de retirar eritrocitos envejecidos de la circulación, previniendo con esto la hemólisis de los eritrocitos en la circulación, evitando problemas inflamatorios, inmunológicos y de daño renal, característicos de las enfermedades hemolíticas. Sin embargo, tanto el incremento como la reducción de la eriptosis tendrían un efecto nocivo sobre la fisiología del organismo. El incremento de la eriptosis puede resultar en anemias y desajustes en el equilibrio síntesis-degradación de eritrocitos, con lo que se incrementa la cantidad de células inmaduras en la sangre y se afecta la maduración de otros tipos celulares de la línea sanguínea; además el incremento de la eriptosis se ha asociado con síndromes urémicos debido a daño renal (Aguilar *et al*, 2014; Lang *et al*, 2015).

La eriptosis puede iniciarse no solo por envejecimiento, sino también puede ser inducida prematuramente por infecciones, por enfermedades metabólicas y por eritrocitos que sufren estrés energético, oxidativo, mecánico y osmótico. Para la eriptosis uno de los principales ejes es el incremento de calcio intracelular libre y se presenta en diferentes patologías entre las que se encuentran: la deficiencia de hierro, la talasemia, la anemia sickle, la deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenada, enfermedades que no solo se caracterizan por anemia, sino a las que se le asocian alteraciones renales, inmunológicas e inflamatorias (Lang *et al*, 2015a).

En nuestro grupo de estudio ya se ha analizado diferentes mecanismos involucrados en el proceso de la eriptosis en intoxicación por plomo. De acuerdo a los datos obtenidos en el presente estudio se encontró *in vivo* un incremento de la actividad de las enzimas fosfolipasa A<sub>2</sub> y esfingomielinasa, asociados a la intoxicación con plomo.

Estudios han demostrado que fosfolipasa A<sub>2</sub> es activada por el estrés osmótico (Lang *et al*, 2005), la cual inicia la vía de señalización que se estudió en el presente trabajo. Se ha comprobado que el plomo provoca el estrés osmótico, porque estimula el aumento de la entrada de calcio al eritrocito y reduce la salida de calcio, ya que se ha demostrado que el plomo provoca estrés energético, de esta manera

reduce la actividad de la ATPasa de calcio (Aguilar *et al*, 2014). Las altas concentraciones de calcio intracelular estimulan la salida de agua, potasio y cloro, por lo que el eritrocito es sometido a estrés osmótico.

Alonso y colaboradores (1990) realizaron un estudio en plaquetas, donde observaron que el ácido araquidónico indujo una entrada de calcio, la cual era inhibida por inhibidores de ciclooxigenasa. Cabe mencionar que un producto de la fosfolipasa A<sub>2</sub> es el ácido araquidónico y puede ser llevado a prostaglandina E<sub>2</sub> por la ciclooxigenasa y la sintetasa correspondiente.

En un estudio realizado por Abed y colaboradores (2012) demostraron que al exponer eritrocitos a esfingomielinasas se inducía el proceso de eriptosis. Uno de los productos de las esfingomielinasas son las ceramidas, las cuales participan como segundos mensajeros en el proceso de apoptosis y en respuestas inflamatorias.

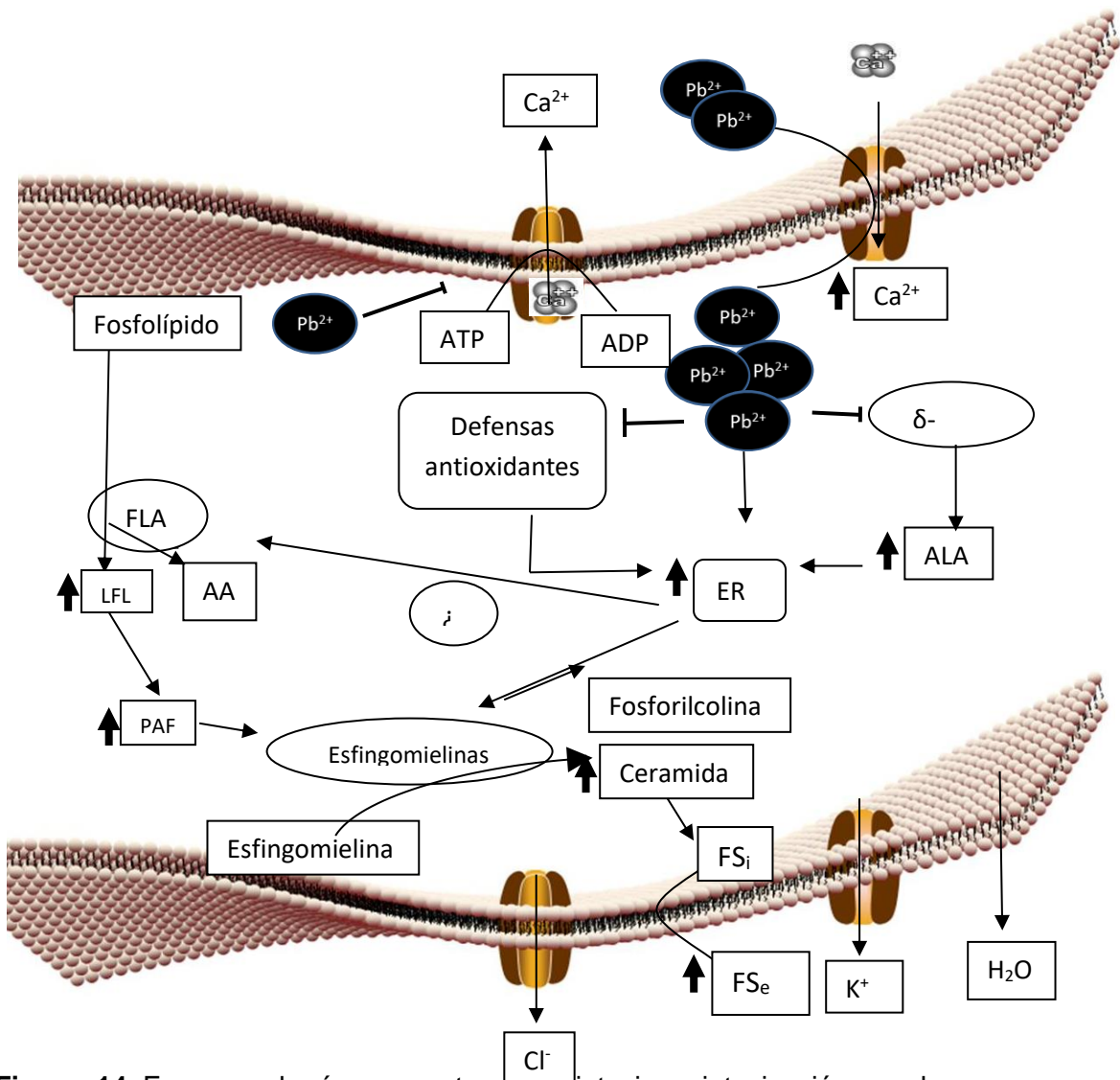
Las esfingomielinasas ácidas y neutras se han involucrado en la participación de los procesos de apoptosis, se evaluó la actividad de la esfingomielinasa neutra en el proceso de eriptosis ya que existe evidencia de la participación de la esfingomielinasa neutra en procesos de apoptosis y su activación en respuesta a estrés oxidativo, o su inhibición por el glutatión (Marchesini y Hannun, 2004; Liu y Hannun, 1997).

En células de cáncer de mama con doxorubicina un quimioterapéutico que estimula la apoptosis por estrés oxidativo, se observó que al sobreexpresar la enzima glutatión peroxidasa disminuían significativamente las especies reactivas de oxígeno y se reducía parcialmente la apoptosis (Marchesini y Hannun, 2004). En el presente estudio el aumento de la actividad de esfingomielinasa neutra en trabajadores intoxicados por plomo puede deberse al aumento de las especies reactivas de oxígeno o a la baja de las defensas antioxidantes que caracteriza la intoxicación por plomo.

La deformación de la membrana del eritrocito se puede deber a la formación de plataformas de ceramidas, las cuales se sabe que se forman en la membrana plasmática con alto contenido de ceramidas (Dinkla *et al*, 2012).

La participación de fosfolipasa  $A_2$  y de esfingomielinasa en la señalización intracelular de la eriptosis en relación con el estrés oxidativo, en los pacientes intoxicados con plomo, complementa y nos permite profundizar en la complejidad de los efectos que puede producir la intoxicación en los diferentes sistemas homeostáticos de las células de los trabajadores (figura 14).

Adicionalmente, los resultados comprueban que existen efectos debido a los distintos tipos de estrés que puede llevar a eriptosis y que la intoxicación con plomo probablemente afecte a más de uno de los mismos en diferentes grados y no solo al oxidativo, debido a la amplia gama de efectos que puede llevar a cabo la intoxicación, el estrés energético por el efecto en las vías metabólicas, el estrés mecánico por el efecto en el citoesqueleto y el osmótico por el efecto en los canales iónicos, son elementos que deberán ser analizados en trabajos posteriores.



**Figura 14.** Esquema de vía propuesta para eriptosis en intoxicación por plomo (modificado de Aguilar, 2016).

## **IX. CONCLUSIONES**

1. Se confirmó que los trabajadores de la recicladora de baterías están expuestos a plomo y lo absorben a concentraciones por arriba de los índices de seguridad y las normas oficiales.
2. Los trabajadores expuestos a plomo presentan intoxicación por plomo, de acuerdo a la disminución de la actividad de ALAD.
3. Los trabajadores tienen daño oxidativo debido a la intoxicación con plomo, caracterizada por lipoperoxidación.
4. Los trabajadores expuestos a plomo tienen disminuidas las defensas antioxidantes, dado la baja capacidad antioxidante.
5. Los trabajadores expuestos a plomo presentan incremento del proceso de eriptosis el cual puede estar relacionado con el estrés oxidativo.
6. De acuerdo a los datos obtenidos, la fosfolipasa A<sub>2</sub> y la esfingomielinasa pueden ser mediadores del proceso de eriptosis en intoxicación por plomo, dado que se encontró un incremento de la actividad de ambas enzimas.
7. El incremento de la ceramida puede estar asociado con el incremento en la translocación de fosfatidilserina, dado el incremento de la actividad de la esfingomielinasa.
8. Este trabajo muestra que hay otros mecanismos moleculares de señalización intracelular involucrados en la generación de eriptosis asociados con estrés oxidativo en trabajadores expuesto a plomo.



## **X. PERSPECTIVAS**

Profundizar en el conocimiento de los mecanismos y las vías metabólicas de la inducción de eriptosis en la intoxicación por plomo.

Participación de la ácido araquidónico en el aumento de la eriptosis en la intoxicación por plomo in vivo.

Profundizar en el conocimiento sobre la participación de las ceramidas en la inducción de eriptosis en la intoxicación por plomo.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abed, M., Towhid, S. T., Mia, S., Pakladok, T., Alesutan, I., Borst, O., Gawaz, M., Gulbings, E. y Lang, F. 2012. Sphingomyelinase-induced adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 303, C991-9.

Aguilar, I.C., Hernández, G., Quintanar, M.A., Maldonado, M, Rosas, M. Calderón, J.V. 2014. Eryptosis in lead-exposed workers, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*

Aguilar, I.C. 2016. El papel de la pge2 y el daño oxidativo como inductores en el proceso de eriptosis en la intoxicación con plomo. Tesis de doctorado. CINVESTAV-IPN

Alonso, M. T., Sanchez, A. & Garcia-Sancho, J. 1990. Arachidonic acid-induced calcium influx in human platelets. Comparison with the effect of thrombin. *Biochem J*, 272, 435-43.

Berg, C.P., Engels, I.H., Rothbart, A., Lauber, K., Renz, A., Schlosser, S.F., Schulze-Osthoff, K. y Wesselborg, S. 2001. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ.* 8 (12):1197-1206.

Burke, J. y Dennis, E. 2008 Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of Lipid Research.* 237-242.

Cabrera D.A. y Cureño M.A. 2006. Intoxicación por plomo. *Sistema nacional de vigilancia epidemiológica.* págs. 2-3. 28.

Calderón, J.V., Valdéz, B., Mazúñiga, Albores, A., 1996. Lead exposure in a population of Mexican children. *Hum. Exp. Toxicol.* 15, 305–311.

Calderón, J.V., Quintanar, M.A., Hernandez, C.E., Gonzalez, M.T., 1999. Effect of lead on the calcium transport in human erythrocyte. *Hum. Exp. Toxicol.* 18, 146–153.

Calderón, J.V. y Maldonado, M. 2008. Contaminación e Intoxicación por Plomo. México.

Diccionario de la Universidad de Salamanca 2011. consultado el 30 de noviembre de 2013: <http://dicciomed.eusal.es/palabra/antioxidante>

Dinkla, S., Wessels, K., Verdurmen, Tomelleri, C., Cluitmans, JCA., Fransen, J., Fuchs, B., Schiller, J., Joosten, I., Brock, R. y Bosman. 2012. Functional consequences of sphingomyelinase-induced changes in erythrocyte membrane structure. *Cell Death and Disease*. 3:410.

Garza, A., Vega, R. & Soto, E. 2006. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med Sci Monit*, 12, RA57-65.

Gouaze, V., Mirault, M. E., Carpentier, S., Salvayre, R., Levade, T. y Andrieu-Abadie, N. 2001. Glutathione peroxidase-1 overexpression prevents ceramide production and partially inhibits apoptosis in doxorubicin-treated human breast carcinoma cells. *Mol. Pharmacol*. 60: 488-496

Gurer-Ohrnan, H., Sabir, H.U., Ozgünes, H. 2004. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology* 195, 147–154.

Halliwell, B. y Gutteridge J. 2002. *Free Radicals in Biology and Medicine*. United States. P.106.

Hannun, Y. A. y Obeid, L. M. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Molecular cell biology* 9: 139-150.

Jones D. 2006. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & redox signaling* 8(9).

Lang P. A., Kempe, D.S., Myssina, S., Tanneur, V., Birka, C., Laufer, S., Lang, F., Wieder T. y Huber, S.M. 2005. PGE<sub>2</sub> in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death and Differentiation* 12: 415–428

Lang E. and Lang F. 2015 Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: The suicidal erythrocyte death.

Lang, E. y Lang, F. 2015a Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 39: 35–42

Lang, K. S., Lang, P. A., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S. M. & Lang, F. 2005. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*, 15, 195-202.

Lang, P. A., Beringer, O., Nicolay, J. P., Amon, O., Kempe, D. S., Hermle, T., Attanasio, P., Akel, A., Schafer, R., Friedrich, B., Rislér, T., Baur, M., Olbricht, C. J., Zimmerhackl, L. B., Zipfel, P. F., Wieder, T. y Lang, F. 2006. Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med (Berl)*, 84, 378-88.

Liu, B. y Hannun, Y. A. 1997. Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *J. Biol. Chem.* 269: 3047-3052.

Maldonado, M. 1996. Plomo: absorción intestinal y movilización del hueso durante la lactancia. Tesis doctoral.

Manzanares, E., Vega, H. R., Escobar, M., Letechipia de León, C., Guzmán, L. J., Hernández, V. M., y Salas, M. Á. 2005. Evaluación de Riesgos ambientales por plomo en la población de Vetagrande, Zacatecas. Retrieved from Unidad Académica de Estudios Nucleares

Marchesini, N. y Hannun, Y. A. 2004. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol.* 82: 27-44.

Mas-oliva, J. 1989. Effect of lead on the erythrocyte ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase activity. Calmodulin involvement. *Mol Cell Biochem*, 89, 87-93.

Miranda, A. 1994. Posible participación de la calmodulina en la fisiopatología de la intoxicación por plomo. Maestría, CInvestav-IPN.

Needleman H. 2004 Lead poisoning. *Annu Rev Med.* 55:209-222.

NOM-047-SSA1-2011. 2011. Salud ambiental-Índices biológicos de exposición para personal ocupacionalmente expuestos a sustancias químicas.

NOM-199-SSA1-2000. 2000. Salud ambiental. Niveles de plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población no expuesta ocupacionalmente.

Ramírez, A. V. 2005. El cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo. *Anales de la Facultad de Medicina*, 66, 57-70.

Re R.; Pellegrini, N., Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical Cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med*; 26 (9/10): 1231–1237.

Rendón, A.; Cerbón, J.; Maldonado M.; Quintanar, M. y Calderón, V. 2007. Vitamin-E reduce oxidative damage on aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *ScienceDirect. México*. P. 1121-1126.

Richardt, G., Federolf, G. y Habermann, E. 1986. Affinity of heavy metal ions to intracellular Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *Biochem Pharmacol*, 35, 1331-5.

Patrick, L. 2006. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev*, 11(1), 2-22.

Patrick L. 2006a Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev.* 11(2):114-127.

Quintanar, M.A. y Calderón, J.V. 2006. Eriptosis, La Apoptosis del Eritrocito. *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. REB* 25(3): 85-89

Quintanar, M.A., González, M.T., Navarro, L., Maldonado, M., Arévalo, B., Calderón, J.V., 2007. Intracellular free calcium concentration and calcium transport in human erythrocytes of lead-exposed workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220, 1–8.

Quintanar, M.A. y Calderón, J.V. 2009. La Capacidad Antioxidante Total. Bases y Aplicaciones. *REB* 28(3): 89-101.

Quintanar, M.A., González, M.T., Del pilar, I.O., 2010. Oxidative damage increases intracellular free calcium [Ca<sup>2+</sup>]; concentration in human erythrocytes incubated with lead. *Toxicol In Vitro* 24, 1338–1346.

Santos, J. L., Fontanellas, A., Batlle, A. M. y Enriquez de Salamanca, R. E. 1998. Reference values of 5-aminolevulinate dehydrase and porphobilinogen deaminase in the Spanish population from Madrid. *Ecotoxicol Environ Saf*, 39, 168-71.

Trachootham, D.; Lu, W.; Ogasawara, M.; Rivera, N. y Huang, P. 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants and redox signaling.* 10:8 p. 1343-1372.

Wada, O., Takeo, K., Yano, Y., Ono, T. & Nagahashi, M. 1976. delta-aminolevulinic acid dehydratase in low level lead exposure. *Arch Environ Health*, 31, 211-5.