

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**“REGULACIÓN DE LA ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) DE ERITROCITOS
HUMANOS POR METALES PESADOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JORGE CONTRERAS LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAIME MAS-OLIVA

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

Formato	Datos
1. Datos del Alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta	1. Datos del Alumno Contreras López Jorge 53 51 49 64 Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Ciencias Biología 075056757
2. Datos del Secretario Tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	2. Datos del Secretario Tutor Doctor Jaime Mas Oliva
3. Datos del Presidente Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	3. Datos del Presidente Doctora Irma Romero Álvarez
4. Datos del Vocal Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	4. Datos del Vocal Doctor René Cárdenas Vázquez
5. Datos del Suplente Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	5. Datos del Suplente Doctora Alicia Ortega Aguilar
6. Datos del Suplente Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	6. Datos del Suplente Doctora Angélica González Oliver
7. Datos de la Tesis Título Número de páginas Año	7. Datos de la Tesis Regulación de la ATPasa(Ca ²⁺ , Mg ²⁺) de Eritrocitos Humanos por Metales Pesados 64 pp 2010

DILUCIDACIÓN

El presente trabajo se inició en 1985 en el laboratorio del Dr. J. Mas Oliva, en el Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. La primera vez que se expuso fue en la IV Reunión de la Rama de Bioenergética y Biomembranas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C., Malintzin, Tlaxcala, México, en diciembre de 1985 con el título de “Regulación por Pb^{2+} de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) de fantasmas de eritrocitos humanos. Efecto de Calmodulina”. Posteriormente fue publicado en las Memorias del IV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C., ese mismo diciembre de 1985. En 1986 se presentó como trabajo de tesis realizado para obtener el grado de licenciado en Biología en la Facultad de Ciencias de la UNAM, bajo el título "Regulación de la ATPasa(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de Eritrocitos Humanos por Metales Pesados", sin concluir el proceso. Hacia los años 1988 y 1989, el Dr. Jaime Mas-Oliva publicó el trabajo en: J. Mas-Oliva. 1988, Dual Effect of Lead on the Erythrocyte Calcium Pump. EBEC Reports (5) 294-296, y J. Mas-Oliva. 1989, Effect of Lead on the Erythrocyte (Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATPase Activity. Calmodulin Involvement. Molecular and Cellular Biochemistry 89 (1) 87-93.

Ahora en 2010, hacemos la recapitulación de dicho trabajo con el único fin de cerrar el proceso iniciado en 1985.

RESUMEN,	4
INTRODUCCIÓN,	5
IMPLICACIÓN DEL COMPLEJO CALCIO/CALMODULINA EN EL PROBLEMA,	13
INTERACCIONES Pb^{2+} / Ca^{2+} ,	20
MATERIAL Y MÉTODOS,	23
MATERIALES,	23
AISLAMIENTO DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE ERITROCITOS HUMANOS, ..	23
MEDICIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE LA ATPasa (Ca^{2+}),	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN,	27
AGRADECIMIENTOS,	38
BIBLIOGRAFÍA,	39
ACTUALIZACIÓN,	53
PERSPECTIVAS,	60
AGRADECIMIENTO FINAL,	65

RESUMEN

A pesar de que en la actualidad son conocidos un gran número de reportes acerca de los efectos tóxicos causados por metales pesados, los mecanismos moleculares de acción de estos sobre diferentes sistemas no han sido aún esclarecidos. Se sabe que algunos de estos metales pesados y en particular el plomo y el cadmio, son serios contaminantes ambientales. Como importante característica en las intoxicaciones causadas por estos contaminantes y principalmente en el caso del plomo, los niveles de este metal en sangre aumentan considerablemente por arriba de los límites aceptados, habiéndose reportado que los eritrocitos humanos secuestran al 90% del plomo en sangre.

En el laboratorio, resultados iniciales indican un marcado efecto inhibitorio del ion plomo sobre la bomba de calcio de eritrocitos humanos, sistema considerado importante en la regulación de homeóstasis del calcio no solamente del eritrocito, sino también de una gran variedad de células tanto animales como vegetales.

El presente estudio constituye un esfuerzo para conocer los efectos moleculares del ion Pb^{2+} sobre la función cinética de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) asociada al transporte de calcio de la membrana plasmática del eritrocito, para contribuir a un mejor entendimiento de la fisiopatología de estas células y de los mecanismos de regulación de la asociación entre ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) y el complejo calcio / calmodulina.

INTRODUCCIÓN

El problema de la contaminación del ambiente en nuestro país se ha incrementado en estos últimos años debido a varios factores que facilitan la concentración de grandes cantidades de sustancias en espacios reducidos de terreno, como lo son las áreas urbanas. Las zonas industriales de la ciudad de México que originalmente se encontraban asentadas lejos de las áreas habitacionales, han sido con el transcurso del tiempo, absorbidas por éstas, ocasionando que importantes grupos de población estén en la actualidad expuestos a agentes potencialmente tóxicos para su salud.

La contaminación de la atmósfera afecta a millones de personas en todo el mundo, especialmente a las que viven en ciudades industrializadas con un denso tránsito de automotores. Las emanaciones y olores desagradables, la reducción de la visibilidad, el daño a la salud humana, así como el daño a la ecología en general por contaminantes nocivos, junto con los perjuicios materiales ocasionados por polvos y gases corrosivos, constituyen algunos de los principales problemas ambientales en las zonas urbanas e industriales de nuestro país. A pesar de que la mayoría de la gente está dispuesta a aceptar cierto deterioro del medio ambiente a cambio de un nivel de vida más alto y de una mayor abundancia de bienes de consumo, a medida que se eleva el nivel de vida, se considera a la contaminación del aire producida por el hombre como a una amenaza para la salud. La contaminación puede llegar a convertir a algunas zonas en lugares no

aptos para ser habitados; esto constituye, en consecuencia, un serio obstáculo para el desarrollo de las sociedades. Así, muchas administraciones nacionales, regionales y municipales son ahora objeto de una creciente exigencia pública de que se combata y disminuya la contaminación del aire. Este tipo de contaminación cobra importancia en condiciones de congestión urbana, ya que los automotores, como producto de su combustión, liberan grandes cantidades de plomo inorgánico al ambiente, entre otros químicos potencialmente tóxicos

Se han reportado gran cantidad de trabajos sobre los efectos tóxicos causados por metales pesados en organismos y sistemas diversos (1-6), pero a nivel molecular aún es desconocido en la mayoría de ellos donde ejercen su acción. La exposición humana a estos químicos se da frecuentemente por diferentes vías ambientales, por lo que un mismo químico puede actuar en un mismo sistema llegando a éste a través de diferentes rutas. Entre las diferentes vías de exposición, a saber, se conocen el aire, el agua y los alimentos ingeridos, así como contacto de la piel con el aire, el agua o las superficies sólidas. El sitio de acción en el cuerpo depende de la naturaleza específica del químico, donde el primer contacto se puede dar en tracto respiratorio, tracto gastrointestinal o la piel, para posteriormente ser absorbido a través de una o más membranas y entrar a la circulación general. A este nivel, el tóxico se encontrará disponible para actuar sobre el sistema hematopoyético y los tejidos internos. El punto final del establecimiento del químico en un organismo depende de sus mecanismos de

transporte, de su afinidad por un tejido específico o componentes tisulares, así como de la distribución del químico a través del tiempo. Como ya se ha podido determinar, el plomo entra al cuerpo a través de la inhalación, ingestión oral o absorción percutánea donde las rutas más significativas son la respiratoria y gastrointestinal para plomo inorgánico (1,7-9). La absorción de plomo por medio del intestino es de alrededor de un 10% en los adultos, y en el caso de los niños se han registrado cifras de hasta un 50%. La absorción de plomo por medio de los pulmones es de alrededor del 50% en los adultos. Se ha reportado que en adultos de ciertas poblaciones urbanas, la absorción por medio de la respiración representa el 30% de la absorción total, pero en el caso de contaminación ocupacional, representa la fuente principal de absorción (10).

El plomo es usado, principalmente, en la manufactura de baterías de almacenamiento eléctrico, cables, tuberías y varios tipos de aleación; en la industria de la maquinaria química; para la protección de radiación radiactiva; en la producción de tetraetil plomo y pigmentos de plomo en la elaboración de cristales, barnices, esmaltes, pigmentos blancos y aceites, así como en la industria de borradores (11). El tetraetil plomo, tetrametil plomo y la mezcla de álcalis derivados del plomo son usados en la gasolina como antiexplosivos, donde en su mayor parte, son convertidos en plomo inorgánico cuando la gasolina es quemada. En muestras de aire contaminado se puede distinguir entre las partículas de plomo y el plomo volátil, donde integrados a este último grupo se

encuentran a los compuestos organoplomados como el tetrametil plomo, trimetiletil plomo, dimetildietil plomo, metiltrietil plomo y tetraetil plomo (12).

Así mismo, la ingestión oral de plomo inorgánico es también otra ruta de exposición importante, donde principalmente la ingestión de alimentos y bebidas contaminadas, incluyendo agua y sustancias no alimenticias como pinturas y polvos que contienen plomo, constituyen un problema serio de salud pública. El plomo transportado por el aire se deposita en los suelos y permanece ahí durante muchos años en las zonas urbanas; el polvo de casas y calles contiene por lo común niveles de plomo del orden de $1 \mu\text{g}/\text{gm}$, como resultado de las emanaciones de los vehículos automotores (el cual corresponde al 90% del plomo total transportado por el aire, alcanzando concentraciones de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en zonas urbanas e inferiores a $0.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en zonas rurales), corrosión de pinturas, las emanaciones industriales o el plomo de los suelos. Las concentraciones de plomo en agua potable son por lo general inferiores a $10 \mu\text{g}/\text{lt}$, pero el uso de cañerías de plomo en las zonas de aguas blandas puede provocar una contaminación considerable y, en algunos casos, alcanzar niveles superiores a $1 \text{mg}/\text{lt}$. Se calcula que la ingestión diaria de plomo por vía alimenticia en diferentes países, oscila entre $< 100\mu\text{g}$ y $> 400\mu\text{g}$. La FAO y la OMS establecieron provisionalmente un límite tolerable de ingestión para los adultos de aproximadamente $400 \mu\text{g}/\text{día}$; dicho valor debe ser inferior en los niños (10).

Diversos estudios experimentales (13-17) han demostrado que existe una relación directa entre la ingestión de plomo y el nivel de plomo en sangre (Pb-S).

Este último constituye una medida del plomo absorbido, siendo el mejor indicador de la exposición actual. El plomo, además de medirse en sangre entera, se puede medir en plasma, saliva, orina, pelo y en los dientes de leche (1). A pesar de que la OMS propone una concentración de seguridad máxima de Pb-S de 3.38 μM , muchas autoridades médicas consideran que el nivel de Pb-S debe ser menor de 1.93 μM en adultos y 1.45 μM en niños. Los niveles normales de Pb-S se encuentran entre 0.97-1.45 μM , derivado de la ingestión de plomo en agua y alimentos. Según numerosos estudios, el nivel de Pb-S medio en adulto no expuestos profesionalmente suele variar entre 0.48 y 1.21 μM (18). En trabajos realizados en la ciudad de México, se señaló que en 1986 la población del D.F. presentaba mayores niveles de Pb-S en comparación con diferentes ciudades de la República Mexicana. Se enfatiza también el hecho de que en últimos estudios se han encontrado los más altos niveles de Pb-S entre los fumadores, por lo cual estiman con respecto a los niveles de Pb en fluidos biológicos, que el tabaquismo es un factor agravante (19).

CONCENTRACIÓN MEDIA DE PLOMO EN SANGRE (μM) SEGÚN CONSUMO DIARIO DE TABACO EN RESIDENTES DE LA CIUDAD DE MÉXICO Y DE SEIS CIUDADES DE LA REPÚBLICA MEXICANA.

Cigarros/día	Ciudad de México		Seis ciudades de la República Mexicana	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
	(n=141)	(n=158)	(n=165)	(n=316)
Ninguno	1.05	0.82	0.70	0.48
Hasta 10	0.86	0.78	0.72	0.49
Más de 10	1.24	0.97	0.81	0.55
Total	1.14	0.79	0.73	0.51

Tomado de (19)

En cuanto al ion plomo (Pb^{2+}) se refiere, los trabajos experimentales en animales, en su mayor parte, describen o tratan de explicar las alteraciones patológicas o fisiopatológicas generales causadas por dicho metal. Por ejemplo, en poblaciones humanas, se han realizado estudios retrospectivos sobre las causas de mortalidad y morbilidad relacionadas con la exposición plúmbica, en comparación con

poblaciones no expuestas. De estos estudios se ha podido comprender los importantes efectos patológicos del plomo en diferentes órganos y sistemas (1).

Los principales efectos reportados causados por plomo podrían ser resumidos de la siguiente manera:

a) Diversos sistemas

- i. Anemia (reversible).
- ii. Nefropatía crónica permanente.
- iii. Daño cerebral severo, particularmente en niños (permanente).
- iv. Conducción alterada en nervios periféricos (puede ser crónica).
- v. Aborto.
- vi. Puede reemplazar al calcio de los huesos.

Los datos presentados anteriormente se refieren a daños funcionales en caso de exposición crónica o de intensidad recurrente al plomo (2).

b) En el sistema hematopoyético en específico, se sabe que el plomo causa los siguientes efectos:

- i. Inhibición de varias enzimas que intervienen en la síntesis del grupo hemo.

- ii. Reducción en la síntesis de globina.
 - iii. Inhibición en la formación del citocromo P450.
 - iv. Administraciones prolongadas afectan la actividad de la citocromo c-oxidasa (1).
- c) Metabolitos y productos anormales acumulados en el plumbismo humano (intoxicación con plomo en humanos):
- i. Puede aumentar el hierro sérico.
 - ii. Ac. gama-aminolevulínico en suero y orina.
 - iii. Porfobilinógeno en orina.
 - iv. Uroporfirina en orina.
 - v. Coproporfirina en eritrocitos y en orina. Protoporfirina IX en eritrocitos.
 - vi. Mitocondrias dañadas y fragmentos de eritrocitos inmaduros.

En la anemia por intoxicación plúmbica aumenta con frecuencia la tasa de descomposición de los eritrocitos: Acortamiento de la vida de los eritrocitos. El mecanismo exacto por el cual ocurre este acortamiento no es completamente conocido. Es posible que el plomo cause un aumento en la fragilidad mecánica y reduzca la resistencia osmótica en las células rojas. De alguna manera se ha

relacionado a estas alteraciones con el hecho de que un 90% del plomo en sangre es capturado por los eritrocitos humanos en casos de intoxicación (6, 20).

IMPLICACIÓN DEL COMPLEJO CALCIO/CALMODULINA EN EL PROBLEMA

De entre los metales de importancia biológica encontramos al ion calcio formando parte de los metales que cumplen requerimientos fisiológicos esenciales. En todas las células en reposo, la concentración de Ca^{2+} libre en el estado-estacionario es de aprox. 10^{-8} M (0.01 μM), muy baja comparada con la concentración de Ca^{2+} libre del medio circundante celular y tisular, que es de aprox. 10^{-3} M (1 μM). Dicho gradiente, cuyo requerimiento energético es de aprox. -10.5 Kcal/mol, es mantenido por bombas de calcio localizadas en las membranas plasmática y reticular, así como en la mitocondria. Se sabe que la concentración de Ca^{2+} libre intracelular no es constante, y se ve modificada por la abertura de canales específicos de calcio que responden a una gran variedad de estímulos externos, a saber: hormonas, alérgenos, anticuerpos de superficie, depolarización membranal, luz o presiones mecánicas. La abertura de dichos canales es seguida por un flujo de iones Ca^{2+} hacia abajo del gradiente electroquímico y un incremento en su concentración en el citosol hasta aprox. 10^{-5} (10 μM). Éste incremento en la concentración de Ca^{2+} libre es dependiente de la duración del estímulo, y a excepción del caso de una cinética retrasada, no es más grande que el estímulo

externo mismo. Por tanto, el incremento de Ca^{2+} libre es transitorio (21). Este ion se ha reconocido como un regulador crítico del metabolismo intracelular, donde estímulos que incrementan la concentración de calcio intracelular aumentan la actividad de muchos sistemas enzimáticos y procesos celulares especializados. Entre estos se encuentran la contracción muscular, la motilidad celular, la secreción exocitótica y la comunicación intercelular (22). Por lo anterior se le ha clasificado como a un mensajero secundario en la mediación de respuestas de varias sustancias humorales, además de ayudar en el mantenimiento del balance osmótico y contribuir en el establecimiento del ambiente general catiónico. En orden de respuesta para una amplia variedad de células a una gran diversidad de estímulos, la regulación temporal y espacial del calcio celular es crítica (23). La complejidad del metabolismo celular del calcio se observa claramente al analizar la diversidad de procesos celulares mediados por calcio, los cuales se presentan en todos los compartimentos celulares (Tabla A).

Los mecanismos mediante los cuales las señales de calcio dependientes son convertidas en respuestas biológicas, requieren de receptores intracelulares capaces de enlazar rápida y reversiblemente éste catión. Durante el incremento transitorio del Ca^{2+} libre como respuesta a un estímulo dado, el Ca^{2+} se enlaza a proteínas intracelulares que pegan calcio; estas últimas interactúan con sus proteínas blancos correspondientes y estimulan su actividad biológica y enzimática. El proceso global finaliza en una respuesta fisiológica por parte de la

célula o el tejido excitado. Estos receptores intracelulares se han reconocido como proteínas enlazadoras de calcio (Tabla B).

TABLA A. Procesos celulares mediados por calcio asociados con compartimentos celulares (24).

Compartimento celular	Procesos
Membrana plasmática	Enlace enzimático
	Glucosa Flujo de K*
	Alteración en el complejo espectrina (sistema contráctil submembranal)
	Actividad adenilatociclasa
	Secreción exocrina y endocrina
	Contracción de microfilamento en el rompimiento celular
	Liberación de neurotransmisores
	Espacios de unión
Citosol	Liberación de troponina
	Actividad de fosforilasa cinasa
	Actividad de fosfodiesterasa
	Estado alterado de ensamble microtubular
	Actividad guanilato ciclasa
	Actividad FDPasa (fructuosa 1,6-difosfatasa)
	Permeabilidad de uniones "gap"
	Transporte axonal
Membrana mitocondrial	Transporte alfa-cetoglutarato
	Intercambio del nucleótido de adenina
	Actividad glicerol fosfato deshidrogenasa
	Actividad SDH (Succinato deshidrogenasa)
Espacio de la matriz mitocondrial	Piruvato deshidrogenasa
	1,25-dihidrocolecalciferol hidrolasa
Núcleo	Síntesis de AND
	Formación de aparato mitótico
Retículo endoplásmico	Síntesis de proteínas

TABLA B. Receptores intracelulares de los procesos regulados por Ca^{2+} .

Receptor	Ca^{2+} / mol	Distribución	Función
Calmodulina	4	Ubicua	Multifuncional
Troponina C	4	Músculo estriado	Regulación de la contracción
Cadena corta de la miosina	1	Ubicua	Regulación de la motilidad
Parvalbúmina	2	Músculo esquelético liso	Desconocida
Proteína sarcoplasmática que pega calcio	1-3	Músculo de invertebrados	Desconocida
S-100	1	Células de la glia	Regulación de la fosforilación protéica
Calcineurina	4	Cerebro	Regulación de la fosforilación protéica
CaBP (Calcium Binding Protein) dependiente de vitamina D	2-4	Intestino, riñon, cerebelo, piel	Desconocida
Oncomodulina	2	Células tumorales	Síntesis de ADN en proliferación celular no regulada
Vilina, gelsolina	3, 2	Ubicua	Rearreglo del cito-esqueleto y la movilidad
Sinhibina, sinexina, calelectrina	no determinado	Tejidos de secreción	Fusión membranal y excitósis

Modificado de (21)

A excepción de la calmodulina, como podemos observar en la tabla B, las demás proteínas son de distribución tisular limitada y parecen responder a procesos tejido-específicos. La molécula calmodulina como proteína reguladora se ha reconocido como de amplia distribución en los tejidos de vertebrados, aunque también se ha encontrado en una gran variedad de especies de invertebrados. Es la proteína reguladora de calcio más versátil en las células eucariontes. Este

receptor ácido de calcio, termoestable, con un peso molecular de 16,500 daltones, es una cadena polipeptídica simple de 148 residuos de aminoácidos, caracterizada por la presencia de trimetilisina y la ausencia de cisteína y triptofano. La calmodulina de los vertebrados contiene dos tirosinas en las posiciones 99 y 138 (Tir₉₉ y Tir₁₃₈), lo que aunado a lo anteriormente mencionado, ha facilitado enormemente el estudio de la molécula mediante mediciones de fluorescencia intrínseca. La Tir₉₉ está expuesta al ambiente hidrofílico de la molécula, ya sea en presencia o en ausencia de Ca²⁺, en comparación con Tir₁₃₈, que en presencia de Ca²⁺ desaparece de la región más hidrofóbica de la molécula. De entre las propiedades espectrales de la Tir₁₃₈, se incluye también un aumento en su emisión de fluorescencia por calcio. La predominancia de aminoácidos ácidos sobre aminoácidos básicos, es a su vez responsable del bajo punto isoeléctrico de calmodulina, mientras que la alta relación de fenilalaninas sobre residuos de tirosina le da la propiedad a la molécula de presentar un coeficiente de extinción bajo ($E_{170}=1.8$) (25). Existe un alto grado de homología entre las proteínas que pegan calcio y la estructura primaria de la calmodulina. Goodman et al., 1979 (26), propusieron que algunas de las proteínas anteriormente nombradas evolucionaron de un ancestro llamado de "cuatro dominantes", el cual se originó de dos duplicaciones sucesivas, una tras otra, de un gen precursor, éste último codificado por un polipéptido de un dominante de aproximadamente 36 residuos de aminoácidos. Se postula que varias proteínas sufrieron mutaciones

puntuales en los supuestos dominantes que pegan calcio, inhabilitándolos para enlazar calcio. Esto explica por qué el número de sitios de pegada de calcio de alta afinidad por proteína, varía de 1 a 4. La homología de la secuencia, principalmente en los dominantes de pegada de calcio aún funcionales, se basan en la similaridad de la estructura tridimensional de éstas proteínas.

Entre la familia de las proteínas homólogas que pegan calcio, la calmodulina es aparentemente la más relacionada con el ancestro proteico y posee cuatro sitios de pegada de calcio funcionales (21). La molécula se asemeja a una pesa con dos lóbulos conectados por una alfa hélice doblada en ocho y sin contacto entre los lóbulos (27). La longitud de la molécula es de aproximadamente 65 Amstrongs y cada lóbulo mide aprox. 25 X 20 X 20 Amstrongs. Contiene siete hélices, las cuales consisten de los siguientes residuos: I 7-19, II 29-39, III 46-55, IV 65-92, V 102-112, VI 119-128, y VII 138-148 Fig. I; contiene aproximadamente el mismo porcentaje de alfa hélice que la troponina C. Los dominantes 1 y 4 que pegan Ca^{2+} tienen una conformación típica "hélice-lazo-hélice" (H-L-H) similar a los dos dominantes que pegan Ca^{2+} en la parvalbumina y a los dominantes III y IV de la proteína intestinal. Los dominantes 2 y 3 muestran una alfa hélice del tipo hélice IV; esta estructura provee una hélice carboxi-terminal para el dominante 2 y una hélice amino-terminal para el dominante 3. Dado que la hélice IV está expuesta a solventes y forma únicamente unos pocos contactos con el resto de la molécula, es posible que esta parte de la misma retenga algunas estructuras

helicoidales en ausencia de Ca^{2+} . Los dominantes 1-4 incluyen los siguientes residuos: 20-31, 56-67, 93-104, y 129-140; cada uno consta de 12 residuos de los cuales los 9 primeros forman el lazo y los tres últimos el comienzo de la segunda hélice en el dominante H-L-H (27).

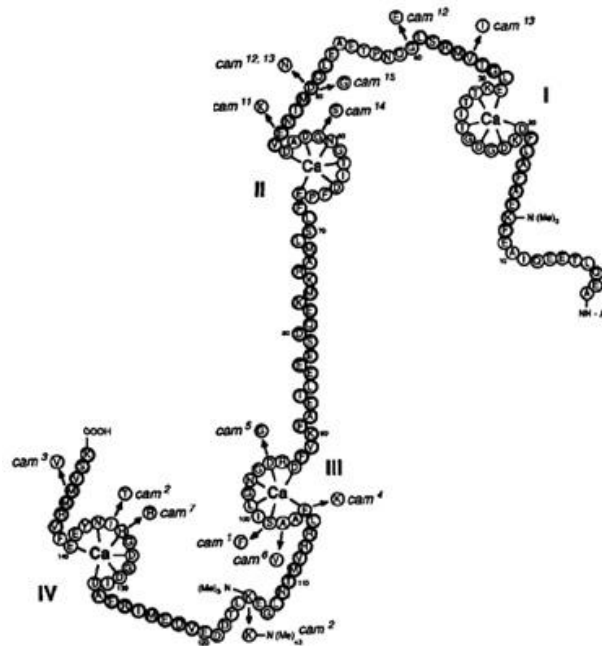


Figura 1. Secuencia de los aminoácidos de la Calmodulina (27).

Ahora bien, ya que se ha reportado que la calmodulina regula varios sistemas enzimáticos, entre ellos a la bomba de calcio o ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+})

membranal, la cual en los eritrocitos humanos su actividad es importantemente estimulada (28), cabe aclarar que la función de la bomba de calcio en los eritrocitos humanos es de suma importancia ya que mantiene constante la concentración de calcio intracelular (0.1 μM). Una elevación en dicha concentración implicaría efectos adversos significativos en la estructura y función de los eritrocitos. Por lo tanto, un funcionamiento normal de la ATPasa como función catalítica de la bomba de calcio, refleja el mantenimiento de las funciones normales de los eritrocitos humanos.

INTERACCIONES Pb^{2+} / Ca^{2+}

El plomo puede interactuar con nutrientes esenciales tal como calcio y fosfato, y elementos traza, como cobre, zinc y hierro (29-32). Muchas investigaciones se han enfocado ahora a los aspectos celulares y moleculares de las acciones del plomo. El plomo inorgánico, forma iones Pb^{2+} en solución acuosa. Este comportamiento es muy semejante al del ion Ca^{2+} cuando este interactúa con sistemas biológicos. Se sabe que la química del plomo es muy diferente a la del calcio y como consecuencia de estas diferencias, el plomo tiene algunos efectos que no son producidos por los iones Ca^{2+} .

El plomo puede, en última instancia, perturbar las funciones mediadas o reguladas por el calcio; directamente por interferencia en los procesos de transporte o almacenaje de calcio (por ejemplo, proteínas transportadoras o vías

de calcio, etc.); indirectamente por la alteración a funciones requeridas para la homeostasis del calcio (v.g. producción de energía, permeabilidad de la membrana plasmática, etc.), o bien, por sustitución de Pb^{2+} por el Ca^{2+} en los sitios de pegada de calcio funcionalmente importantes (v.g. Calmodulina) (24).

El Pb^{2+} parece ser un buen sustituto del Ca^{2+} en los siguientes procesos de calcio dependientes: canales de calcio en la membrana de células de médula adrenal de bovino, entrada de calcio en mitocondria, fosfodiesterasa dependiente de calcio y calmodulina (y algunos otros procesos dependientes de calmodulina), unión a proteínas intestinales que pegan calcio, permeabilidad al potasio dependiente de calcio en eritrocitos humanos y bomba de calcio y ATPasa de calcio de eritrocitos humanos. En todos los casos anteriores la afinidad por plomo es más grande que por calcio. Aún no han sido estudiadas las interacciones del Pb^{2+} con muchas proteínas que pegan calcio y procesos dependientes de calcio. No todos los procesos dependientes de calcio son activados por plomo; puede ser que dicho metal reconozca perfectamente el sitio de calcio pero a su vez inhiba cualquier otro sitio que esté envuelto en la respuesta total (32).

En vista de que existen pocas investigaciones realizadas sobre la bomba de calcio de eritrocitos humanos afectada por metales pesados, en nuestros días donde el problema de contaminación ha crecido enormemente, el estudio del efecto de metales pesados sobre estos sistemas ha cobrado importancia.

Como ya hemos mencionado anteriormente, la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) es estimulada por la calmodulina, una proteína moduladora que participa en diversos procesos biológicos dependientes de calcio (33). Sin embargo, a pesar de que la relación calmodulina-ATPasa es conocida, los procesos moleculares por los cuales ésta se lleva a cabo no han sido aún bien determinados. En vista de la importancia que representa lo anteriormente expuesto, nos encaminamos a la tarea de tratar de definir los efectos provocados por el plomo sobre la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) de eritrocitos humanos, así como la relación de dicho metal con la proteína moduladora calmodulina. De esta manera, el presente estudio pretende contribuir a conocer los efectos del ión Pb^{2+} sobre la actividad de ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) como expresión cinética de la bomba de calcio y determinar su acción en la relación ATPasa con el complejo calcio/calmodulina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales.

Acetato de plomo, suero de albúmina, adenosín trifosfato (ATP) y ditioneitol (DTT) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. La calmodulina (activador de la 3*,5*-nucleótido cíclico fosfodiesterasa de corazón de bovino) fue obtenida en nuestro laboratorio por el método de Gopala Krishna y Anderson, 1982 (34).

Aislamiento de membrana plasmática de eritrocitos humanos.

El método presentado a continuación, es una modificación de la técnica empleada anteriormente en este laboratorio (35, 36).

Preparación de fantasmas de eritrocitos:

- 1) Centrifugación de sangre heparinizada (una unidad) durante 10 minutos a 3000 rpm (1.475 X g), rotor GSA.
- 2) Se aspira el plasma y se remueve la capa colorante.
- 3) Lavar las células por centrifugación en seis volúmenes de solución isotónica # 1.

Solución isotónica # 1 pH = 7.4

KCl 0.13 M

Tris (base) 20 mM

La centrifugación se realiza en el rotor GSA a 13,000 rpm (28,880 X g) durante 20 minutos.

Se realizan dos lavados.

4) Lavar las células por centrifugación en seis volúmenes de solución hipotónica # 2.

Solución hipotónica # 2 pH = 7.4

EDTA 1 mM

Tris (base) 5 mM

La centrifugación se realiza en el rotor GSA a 13,000 rpm (28,800 X g) durante 20 minutos.

Las células se lavan hasta que el precipitado esté completamente blanco.

5) Lavar las células por centrifugación en seis volúmenes de solución isotónica # 3.

Solución isotónica # 3 pH = 7.4

Tris (base) 10 mM

La centrifugación se realiza en el rotor GSA a 13,000 rpm (28,800 X g) durante 20 minutos.

Realizar dos lavados con dicha solución.

Se utilizó una centrífuga SORVALL RC-5B (Refrigerated Superspeed Centrifuge).

Posteriormente, las células fueron colocadas en viales y mantenidas a -80 C° hasta su uso, en un controlador de temperatura REVC0 (REVC0 Temperature Controller ULTRA LOW).

La concentración de proteína de los fantasmas fue medida siguiendo el método descrito por Bradford (37), usando suero de albúmina como estándar.

Medición de las actividades de la ATPasa (Ca^{2+})

Actividad hidrolítica del ATP. Dicha actividad fue medida utilizando una técnica empleada anteriormente en nuestro laboratorio (35, 36, 38, 39). Se midió espectrofotométricamente la liberación de fosfato inorgánico (Pi), expresado en nano molas de Pi/mg de Proteína/minuto.

El medio de incubación de la enzima contenía MgCl_2 10 mM, CaCl_2 5, 10 o 100 μM , ATP 0.5, 1, 2 o 4 mM, TX-100 0.1% y Tris-Malato 50 mM a un $\text{pH}=7.4$. La concentración de la calmodulina fue de 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Se manejaron diferentes concentraciones de acetato de plomo, de 0.1 a 150 μM . El tiempo de incubación fue de 20 minutos. La reacción enzimática se inició por la adición de la mezcla de reacción que contenía ATP y fue detenida con 100 μl de TCA (Ácido Tricloroacético) 30%, manteniendo las muestras a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El agente reductor de grupos sulfhidrilo DTT, fue preincubado en presencia de las membranas a 4 °C durante una hora.

2

6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se exploró de manera inicial el efecto del ion plomo sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) contenida en una preparación de membranas plasmáticas de eritrocitos humanos. Como se puede observar en la figura 1, el comportamiento de la ATPasa utilizando diferentes concentraciones de calcio y en presencia de concentraciones μM de plomo, no es el de una cinética de inhibición simple. El tipo de inhibición que se observa corresponde a una inhibición del tipo multisitio para un solo inhibidor (40), por lo que los métodos convencionales para calcular las diferentes constantes de inhibición no son aplicables en este caso. Por lo tanto, se sugiere el uso de la llamada concentración inhibitoria al 50% ó CI_{50} (concentración del inhibidor necesaria para reducir la actividad máxima de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) al 50%) para calcular semi-cuantitativamente el efecto inhibitorio del ion plomo (40).

En la misma figura 1 podemos observar que a medida que la concentración de calcio en el medio de reacción aumenta, los valores CI_{50} para el plomo disminuyen discretamente. De manera interesante, también ha sido observado que en presencia de calmodulina los valores CI_{50} disminuyen, pero presentando valores absolutos menores que durante la medición de la actividad de ATPasa en ausencia de la proteína moduladora. Esto último parecería indicar una mayor susceptibilidad de la enzima al plomo al encontrarse asociada con el complejo calcio/calmodulina.

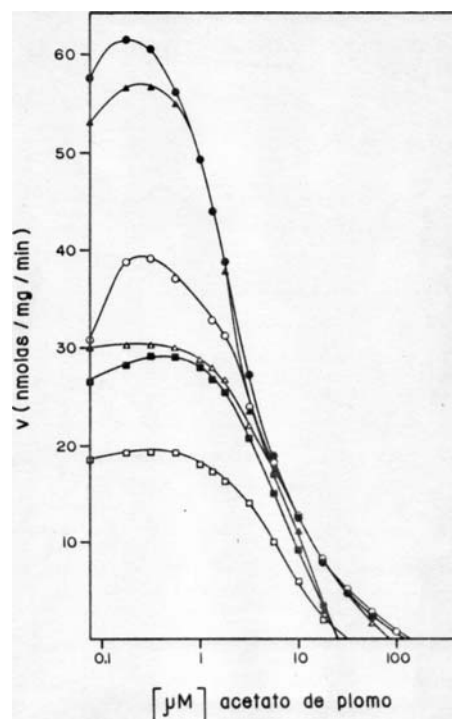


Figura 1. Inhibición de la actividad hidrolítica de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) de eritrocitos humanos causada por acetato de plomo. La actividad enzimática fue medida en ausencia (\square \circ \triangle) ó presencia (\blacksquare \bullet \blacktriangle) de calmodulina (10 $\mu\text{g}/\text{mg}$), usando diferentes concentraciones de calcio: 5 ($\square\blacksquare$), 10 ($\triangle\blacktriangle$) y 100 μM ($\circ\bullet$).

TABLA I

* CI_{50} μM Pb^{2+}			
Ca^{2+} μM	Calmodulina		
	-	+	
5	17.5	8.5	
10	8.75	4.5	
100	6.0	4.0	

* Resultados relacionados con la figura 1.

Al explorar el efecto del ion plomo sobre la ATPasa expuesta a una concentración de calcio de 100 μM y a 1 as concentraciones de ATP de 0.5 y 4.0 mM, como es mostrado en la figura 2, al aumentar la concentración de ATP en el medio de reacción, los valores de CI_{50} tienden a disminuir. De manera interesante, nuevamente **la presencia del complejo calcio / calmodulina en el medio de reacción, disminuye los valores CI_{50} de la enzima para el ion plomo (tabla II).**

Utilizando una serie diferente de preparaciones de fantasmas de eritrocitos, los cuales fueron inicialmente preincubados a 4°C por 1 hora en presencia de calmodulina; a pesar de obtener valores de ATPasa iniciales más elevados que los presentados en la figura 2, a medida que se incrementa la concentración de ATP en el medio de reacción (0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 μM), los valores observados de CI_{50} para el ion plomo no sufren variaciones importantes (fig. 3; tabla III). Este resultado, al haber sido ampliamente reproducido en nuestro laboratorio utilizando diferentes preparaciones de fantasmas de eritrocitos, parece indicar que independientemente del valor de la actividad hidrolítica basal de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) en presencia de calmodulina, la CI_{50} para el ion plomo se mantiene constante.

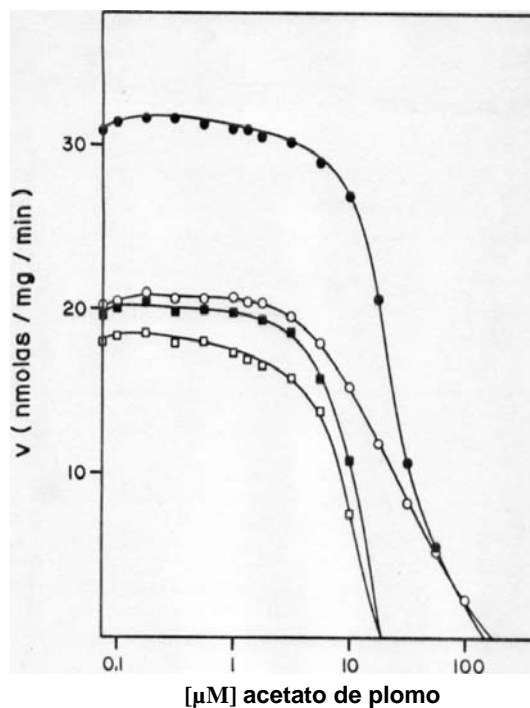


Figura 2. Inhibición de la actividad hidrolítica de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) de eritrocitos humanos causada por el acetato de plomo. La actividad enzimática se midió en ausencia ($\square \circ$) ó presencia ($\blacksquare \bullet$) de calmodulina (10 $\mu\text{g}/\text{mg}$), utilizando dos concentraciones de ATP: 0.5 ($\square \blacksquare$) y 4.0 μM ($\circ \bullet$).

TABLA II

* CI_{50} μM Pb^{2+}			
ATP μM	Calmodulina		
	-	+	
0.5	35.5	27.5	
4.0	20.75	11.5	

* Resultados relacionados con la figura 2.

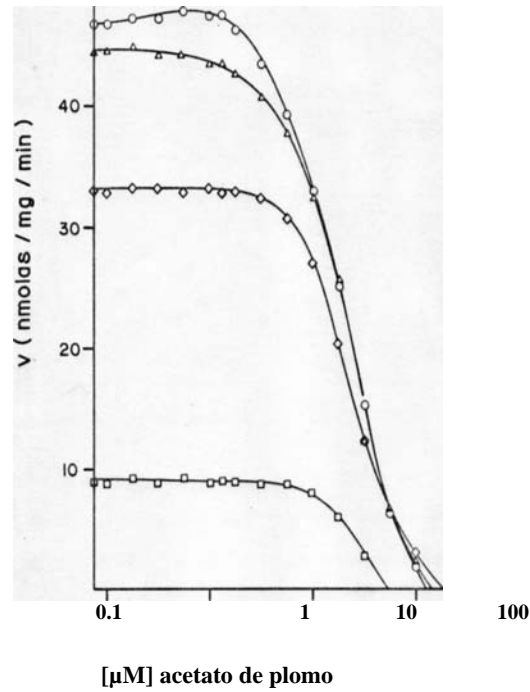


Figura 3. Inhibición de la actividad hidrolítica de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) de eritrocitos humanos causada por acetato de plomo. La actividad enzimática se determinó usando el siguiente rango de concentraciones de ATP: 0.5 (\square), 1.0 (\diamond), 2.0 (\triangle) y 4.0 μM (\circ).

TABLA III

* CI_{50} μM Pb^{2+}	
ATP Mm	Calmodulina
	+
0.5	27.5
1.0	25.5
2.0	17.5
3.0	11.5

* Resultados relacionados con la figura 3.

Con la finalidad de explorar el papel que juegan tanto uniones disulfuro como grupos sulfhidrilo en la acción inhibitoria del ion plomo sobre la actividad de ATPasa como función catalítica de la bomba de calcio, se iniciaron una serie de experimentos utilizando al agente reductor de sulfhidrilos, ditioneitol (DTT). Utilizando dos concentraciones de DTT (0.25 y 1.0 mM) durante el período de incubación de la ATPasa a 37°C en el medio de reacción, no se observó efecto alguno sobre la cinética de inhibición de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) por el ion plomo (fig. 4), donde el desplazamiento de los valores CI_{50} por DTT fue mínimo (tabla IV). Sin embargo, observamos que secundario a la pre incubación de las membranas por una hora a 4°C en presencia de DTT y especialmente a la concentración de 1 mM, se obtiene un importante desplazamiento de las CI_{50} para el ion plomo hacia concentraciones más elevadas; (fig. 5; tabla V). Esto último pareciera indicar la necesidad de tiempos prolongados de preincubación para llevar a cabo una reducción importante de radicales sulfhidrilo y la formación de uniones disulfuro en las membranas, lo que estaría aunado a la presencia de estos grupos funcionales en la enzima y a la protección del efecto inhibitorio del ion plomo. La reducción de grupos sulfhidrilo, reflejado en una menor sensibilidad de la ATPasa a la acción del plomo, indicaría la importancia de la formación de uniones disulfuro en la región catalítica de esta enzima. De manera simultánea con el presente estudio, utilizando una preparación aislada de membranas plasmáticas de músculo cardíaco y el empleo de la sonda fluorescente 5-iodoacetoamidofluoresceina, la

cual reacciona con grupos sulfhídrido, hemos podido corroborar la importancia de la formación de uniones disulfuro en el desarrollo de la actividad catalítica de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) (41).

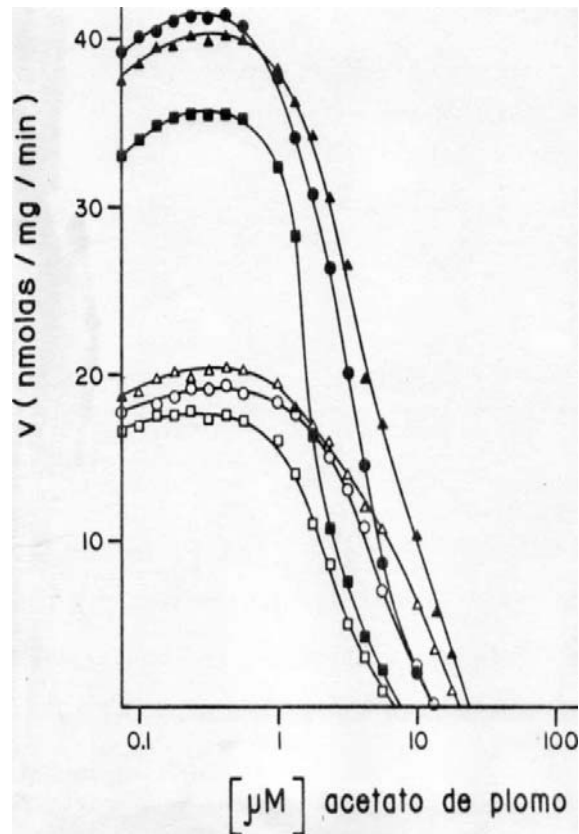


Figura 4. Inhibición de la actividad hidrolítica de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) de eritrocitos humanos causada por acetato de plomo. La actividad enzimática se midió utilizando dos concentraciones de ditioneitol (DTT) durante el período de incubación de las membranas a 37°C en el medio de reacción: 0 (□ ■), 0.25 (△ ▲) y 1.0 mM (● ○). La actividad fue medida en ausencia (□ △ ○) ó presencia (■ ▲ ●) de calmodulina (10 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

TABLA IV

* CI ₅₀ μM Pb ²⁺			
DTT μM	Calmodulina		
	-	+	
0	7.87	6.50	
250	3.50	2.35	
1000	6.50	5.0	

* Resultados relacionados con la figura 4.

En vista de no haberse observado diferencia alguna entre las membranas incubadas en presencia o ausencia de calmodulina con respecto a los efectos, primero inhibidor del plomo y segundo, protector del DDT (tablas IV, V), pareciera indicar la ausencia de estos grupos funcionales en el sitio de acoplamiento entre la enzima y el complejo calcio/calmodulina. Sin embargo, analizando nuestros resultados, hemos observado una consistente estimulación de la actividad de ATPasa utilizando concentraciones bajas de plomo en los medios de reacción (0.1 - 1.0 μM), siendo esto más evidente en condiciones óptimas de concentración de calcio, ATP y calmodulina (figuras 1-5). Este resultado aunado al hecho ya bien comprobado de que el ion calcio no es específico en la activación de calmodulina

y de que otros cationes con afinidades y radio iónico comparables al del calcio pueden ser efectivos en esta activación, el fenómeno podría estar relacionado con un desplazamiento del ion calcio por plomo. Parece ser que a concentraciones bajas de plomo, éste ion no interfiere con la efectividad del ion calcio en la activación de la calmodulina, sino que acentúa dicha efectividad; éste fenómeno aumenta la posibilidad de que una combinación de cationes efectiva pueda activar a la calmodulina completamente a una concentración subóptima de calcio (42, 43). Esta posibilidad se encuentra apoyada en estudios de inhibición por metales pesados de la unión de calcio a la molécula calmodulina (44, 45). Sin embargo, a pesar de conocerse el hecho de que algunos metales pesados (y entre ellos el plomo) mimetizan el efecto del ion calcio en la inducción del cambio en la fluorescencia intrínseca de calmodulina dada por tirosina, cambio en su movilidad electroforética, activación de la enzima fosfodiesterasa, e inhibición de la unión de calcio a calmodulina, aún no existen estudios directos de unión específica de plomo a calmodulina.

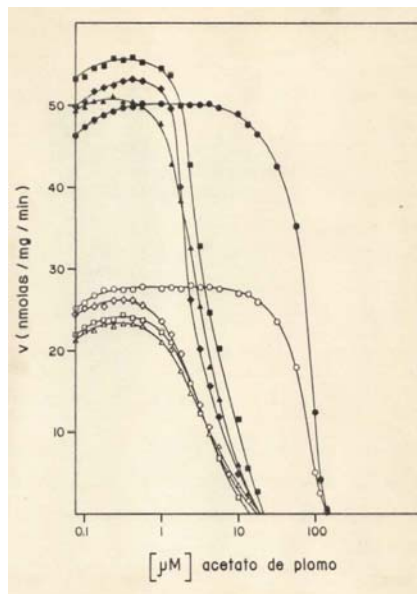


Figura 5. Inhibición de la actividad hidrolítica de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) de eritrocitos humanos provocada por acetato de plomo. La actividad enzimática fue medida posteriormente a la preincubación de las membranas por 1 hr. a 4°C en presencia de DTT: 0 (\diamond \blacklozenge , 0.05 (\triangle \blacktriangle), 0.25 (\square \blacksquare) y 1.0 mM (\bullet \circ). La actividad hidrolítica se midió en ausencia (\square \diamond \triangle \circ) ó presencia (\blacksquare \blacklozenge \blacktriangle \bullet) de calmodulina (10ug/mg).

TABLA V

* CI_{50} μM Pb^{2+}		
DTT μM	Calmodulina	
	-	+
0	5.50	6.50
50	5.00	3.75
250	5.50	5.50
1000	85.00	90.00

* Resultados relacionados con la figura 5.

Ahora bien, la aparente efectividad de algunos metales pesados en conferir un estado activo a la molécula calmodulina, no necesariamente significa que estos metales presenten alguna función fisiológica en los diferentes sistemas estudiados, sino que más bien en nuestra opinión originan la posibilidad de que parte de su toxicidad en multitud de sistemas biológicos sea mediada a través de una activación anormal de calmodulina. Esta posibilidad podría estar relacionada con la activación de calmodulina a concentraciones subóptimas de calcio, lo que privaría a las células de su control normal llevado a cabo por el ion calcio.

En condiciones de una activación crónica anormal de calmodulina, el control normal de activación podría estar totalmente alterado, lo que creemos, en parte podría explicar la base molecular de la toxicidad de los diferentes metales pesados a concentraciones contaminantes sumamente pequeñas.

En base a los datos experimentales obtenidos en el laboratorio, nuestro punto de vista apoyado en el desarrollo experimental permite proponer dos bien definidas acciones del ion Pb^{2+} sobre la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) plasmalemal; la primera una acción de cooperatividad a través de la interacción del plomo ($< 1.0 \mu M$) y el calcio sobre la proteína reguladora calmodulina, y la segunda, una acción inhibitoria del plomo ($> 1.0 \mu M$) a través de la interacción con los grupos sulfhidrilo esenciales de la enzima.

AGRADECIMIENTOS

Los experimentos presentados fueron en parte apoyados por el Fondo de Estudios e Investigaciones R. J. Zevada del Banco BCH, CONACyT (proyecto ICSAXNA-001872) y por una Beca-Tesis del CONACyT. Se agradece el suministro de sangre humana por parte de la Q.F.B. Alicia Martínez Gallegos del banco de sangre del I.N.C., y la colaboración de la Sra. Ma. Elena Gutiérrez.

BIBLIOGRAFÍA

1. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) 1979. Criterios de Salud Ambiental 3. Plomo. Publicación científica # 389. Servicio de Publicaciones y Documentación OPS/OMS. México, D.F.
2. Chilsom, J.J. 1971. Lead Poisoning Physiology and the Environment in Health and Disease. Readings from Scientific American. Vander, A.S., W.H. Freeman and Company. San Francisco.
3. Unni. L.K. and M.L. Casper. 1985. Inhibition of bovine brain monoamine oxidase by lead. *Biochem. Pharmacol.* 34(14):2563-2566.
4. Richard, G., Federolf, G. and E. Habermann. 1986. Affinity of heavy metal ions to intracellular Ca^{2+} -proteins. *Biochem. Pharmacol.* 35(8):1331-1335
5. Chilsom, J.J. Jr. 1985. Pediatric Exposures to Lead, Arsenic, Cadmium, and Methyl Mercury. In *Trace Elements in Nutrition of Children*, edited by R.K. Chandra. Nestlé Nutrition, Vevey/Raven Press, New York, pp 229-261.
6. Conor Reilly 1980. Metal Contamination of Food. Applied Science Publishers. LTD. London. pp 85-104, 214-215
7. World Health Organization 1980. Recommended health-based limits in occupational exposure to heavy metals, report of a WHO Study Group. Tech. Rep. Ser. 647p.. Geneva, World Health Organization.

8. Task group on metal accumulation 1973. Environmental physiology and biochemistry 3:65-107.
9. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). 1985. Assessment of human exposure to lead: Comparison between Belgium, Malta, México and Sweden. PNUMA y OMS.
10. Informe del PNUMA No 1. 1984. "Lista de sustancias y procesos químicos peligrosos para el medio ambiente con repercusiones mundiales". RIPQPT-Ginebra.
11. Izmerov, N.F. (Ed). United Nations Environment Programme UNEP, International Register of Potentially Toxic Chemicals (IRPTC). 1983. Scientific Reviews of Soviet Literature on toxicity of Chemicals 42. Lead. Center of International Projects, GKNT. Moscow.
12. Goulden, P.D. 1980. Environmental Pollution Analysis. Hexden, London. pp 53-70.
13. Unni, L.K. and M.L. Casper. 1984. Inhibition of bovine plasma amine oxidase by lead. Biochem. Pharmacol. 33(13):2149-2151.
14. Sherlock, J., Smart, G. Forbe, G.I., Moore, M.R., Patterson, W.J., Richards, W.N. and T.S. Wilson. 1982. Assessment of lead intake and dose-response for a population in Air exposed to a plumbosolvent water supply. Hum. Toxicol. 1:115-122.

15. Aungst, B.J. and H.L. Fung. 1981. Intestinal lead absorption in rats: Effects of circadian rhythm food, undernourishment and drugs which alter gastric emptying and GI motility. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 34:515-530.
16. Stuik, E.J. 1984. Biological response of male and female volunteers to inorganic lead. Int. Arch. Arbeitsmed. 33:83-97.
17. Gross, S.B. 1981. Human oral and inhalation exposures to lead: Summary of Kehoe balance experiments. J. Toxicol. Environ. Health 8:333-377.
18. Grupo de estudio de la Organización Mundial de la Salud. 1980. Series de informes técnicos No. 647. Límites de exposición profesional a los metales pesados que se recomiendan por razones de salud. OMS, Ginebra.
19. Sector Salud (SSA, IMSS, ISSSTE, DIF) 1987. La contaminación atmosférica en la Zona metropolitana de la Ciudad de México: Riesgos en la salud y recomendaciones a la población. Boletín Sector Salud.
20. Mauci, E.A., Cabaniss, M.L., Boesth, R.C. and W.R. Blackburn. 1986. Blood lead and chronic blood loss. Fed. Proc. 45(3):439.
21. Cox, J.A., Compte, M., Malnoáe, A., Burger, D. and E.A. Stein. 1984. Mode of action of the regulatory protein calmodulin. Metal ions in biological

- systems 1. Calcium and its role in biology. Ed. Helmie Sigel. Geneva, Switzerland.
22. Rasmussen, H. 1981. Calcium and cAMP as Synarchic Messengers. John Wiley and Sons. New York, N.Y.
 23. Ramussen, H. and D.M. Waisman. 1983. Relationship between calcium and nucleotides in cell activation. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 95:111-148.
 24. Pounds, J.G. 1984. Effects of lead intoxication on calcium-mediated cell function: A review Neurotoxicology 5(3):295-332.
 25. Mas-Oliva, J. 1986. Calmodulina como reguladora de múltiples funciones celulares moduladas por calcio.
 26. Goodman M., Pechère, J.-F, Haiech, J. and J.G. Demaille. 1979. Mol. Evol. 13(42):331.
 27. Babu, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.J., Bugg, CH.E., Means, A.R. & W.J. Cook. 1985. Three-dimensional structure of calmodulin. Nature 315(may):37-40.
 28. Carafoli, E. 1984. Calmodulin-sensitive calcium-pumping ATPase of plasma membranes: isolation, reconstitution, and regulation. Fed. Proc. 43(15):3005-3010.

29. Sobel, A.E., Yusha, H., Peters, B.D. and D. Mahaffey. 1940. The biochemical behavior of lead. I. Influence of calcium and phosphorus on the metabolism of lead. *J. Nutr.* 21:541-545.
30. Shields, J.B. and H.H. Mitchell. 1941. The effect of calcium and phosphorus on the metabolism of lead. *J. Nutr.* 21:541-547.
31. Aungust, B.J. and Fung, Ho-Lung. 1985. The effects of dietary calcium on lead absorption, distribution, and elimination kinetics in rats *J. Toxicol. Environ. Hlth.* 16:147-159.
32. Simons, T.J.B. 1986. Cellular interactions between lead and calcium. *British Medical Bulletin* 42(4):431-434.
33. Al-Jobore, A, Minicherhomjee, A.M., Villalobo, A. and B. D. Roufogalis. 1984. Active calcium transport in normal and abnormal human erythrocytes. *Erythrocytes Membranes 3. Recent Clinical and Experimental Advances* pp 243-292.
34. Gopala Krishna and Wayne B. Anderson. 1982. Ca^{2+} induced hidrofobic site on calmodulin aplication for purification of calmodulin by phenyl-sepharose affinity chromatography. *B. B. Res. Commun.* 104:830-836.
35. Mas-Oliva, OL. 1985. Synthesis of ATP catalyzed by the (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase from erythrocyte ghosts. Energy conservation in plasma membranes. *Biochim. et Biophys. Acta* 812:163-167.

36. Mas-Oliva, J., Williams, A., y W.G. Nayler. 1979. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 87:441-447.
37. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
38. Ortega, A. and J. Mas-Oliva. 1984. *Biochim. et Biophys. Acta* 773:230-236.
39. Mas-Oliva, J., de Meis, L. and G. Inesi. 1983. *Biochemistry* 5822-5825
40. Segel, I.H. 1975. *Enzyme Kinetics*. John Wiley and Sons. Ed. Toronto. USA. pp 465-473.
41. Cardenas-García, M. and Mas-Oliva, J. 1985. Fluorescent labeling of isolated cardiac sarcolemma by 5-iodoacetamide fluorescein: Effect on (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase. *FEBS Lett.*
42. Habermann E., Crowel1 K. and P. Janicki. 1983. Lead and other metals can substitute for Ca²⁺ in calmodulin. *Arch. Toxicol.* 54:61-70.
43. Chao, S.H., Suzuki, Y., Zysk, J.R. and Cheung, W.Y. 1984. Metal cation-induced activation of calmodulin is a function of ionic radii. *Mol. Pharmacol.* 26:75-82.
44. Mills J.S. and Johnson J.D. 1985. Metal ions allosteric regulators of calmodulin. *J. Biol. Chem.* 260:13100-13105.

45. Wallace, R.W., Tallant, E.A., Docker, M.E. and W.Y. Cheung. 1982. Calcium binding domains of calmodulin. *J. Biol. Chem.* 257:1845-1854
46. *** Bruce P. Lanphear, Richard Hornung, Jane Khoury, Kimberly Yolton, Peter Baghurst, David C. Bellinger, Richard L. Canfield, Kim N. Dietrich, Robert Bornschein, Tom Greene, Stephen J. Rothenberg, Herbert L. Needleman, Lourdes Schnaas, Gail Wasserman, Joseph Graziano, and Russell Roberts. 2005. Low-Level Environmental Lead Exposure and Children's Intellectual Function: An International Pooled Analysis. *Environ Health Perspect* 113:894-899.
47. Lourdes Schnaas, Stephen J. Rothenberg, Maria-Fernanda Flores, Sandra Martinez, Carmen Hernandez, Erica Osorio, Silvia Ruiz Velasco and Estela Perroni. 2006. Reduced Intellectual Development in Children with Prenatal Lead Exposure. *Environ Health Perspect* 114:791–797.
48. Martha M. Tellez-Rojo, David C. Bellinger, Carmen Arroyo-Quiroz, Hector Lamadrid-Figueroa, Adriana Mercado-Garcia, Lourdes Schnaas-Arrieta, Robert O. Wright, Mauricio Hernández-Avila, Howard Hu. 2006. Longitudinal Associations Between Blood Lead Concentrations Lower Than 10 g/dL and Neurobehavioral Development in Environmentally Exposed Children in Mexico City. *Pediatrics* 118:323-330.
49. Centers for Disease Control and Prevention 2005. Preventing Lead Poisoning in Young Children. Atlanta: CDC.

50. CDC 1991. Preventing lead poisoning in young children. Atlanta: US Department of Health and Human Services. Available from <http://www.cdc.gov/nceh/lead/publications/books/plpyc/contents.htm>
51. Aníbal Garza, Rosario Vega, Enrique Soto. Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. 2006. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med Sci Monit* 12(3):RA57-65.
52. Christophe Gourlaouen and Olivier Parisel. 2007. Is an Electronic Shield at the Molecular Origin of Lead Poisoning? A Computational Modeling Experiment. *Angew. Chem. Int.* 46:553–556.
53. Liat Shimoni-Livny, Jenny P. Glusker and Charles W. Bock. 1998. Lone Pair Functionality in Divalent Lead Compounds. *Inorg. Chem.* 37:1853-1867.
54. Vasquez, A.H. 2004. Síntesis y caracterización de complejos de coordinación de ácido acetilsalicílico (Aspirina®) con los iones metálicos Al^{3+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} . Disponible en http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/vasquez_a_h/
55. David Chin and Anthony R. Means. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *trends in CELL BIOLOGY* 10(August):322-328.
56. Crystal Structure of Pb-bound Calmodulin. Available from <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1N0Y>

57. [***](#) J. Contreras. Julio de 1985 a Febrero de 1986. Regulación de la ATPasa(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de Eritrocitos Humanos por Metales Pesados". Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Comisión de Servicio Social, Reporte realizado como Servicio Social en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, 46p..
58. J. Contreras y J. Mas-Oliva. 1985. Regulación de la ATPasa(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de Eritrocitos Humanos por Metales Pesados. Mensaje Bioquímico. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM IX, pp103-127.
59. J. Mas-Oliva. 1988. Dual Effect of Lead on the Erythrocyte Calcium Pump EBEC Reports (5):294-296.
60. J. Mas-Oliva. 1989. Effect of Lead on the Erythrocyte(Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATPase Activity. Calmodulin Involvement. Molecular and Cellular Biochemistry 89(1):87-93.
61. Michael J. Engle and Joseph J. Volpe. 1990. Glutamine synthetase activity of developing astrocytes is inhibited in vitro by very low concentrations of lead. Developmental Brain Research 55:283-287.
62. S. Hechnberg and D. Beyersmann. 1991. Inhibition of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Activity by Cadmium, Lead and Mercury. Enzyme 45:109-115.

63. M. E. Legare, R. Barhoumi, R. C. Burghardt and E. Tiffany-Castiglioni. 1993. Low-Level Lead Exposure in Cultured Astroglia: Identification of Cellular Targets with Vital Fluorescent Probes. *Neurotoxicology* 14(2-3):267-272.
64. Visser GJ, Peters PH. and AP. Theuvenet. 1993. Cadmium ion is a non-competitive inhibitor of red cell Ca^{2+} -ATPase activity. *Biochim Biophys Acta* 1152(1):26-34.
65. Sandhir, R. and K.D. Gill. 1994. Calmodulin and cAMP dependent synaptic vesicle protein phosphorylation in rat cortex following lead exposure. *Int J Biochem* 26(12):1383-1389.
66. Rajat Sandhir and Kiran Dip Gill. 1994 February. Alterations in calcium homeostasis on lead exposure in rat synaptosomes. *Journal Molecular and Cellular Biochemistry* 131(1):25-33.
67. Qian, Yongchang, Evelyn Tiffany-Castiglioni and Edward D. Harris. 1995. Copper transport and kinetics in cultured C6 rat glioma cells. *Am. J. Physiol.* 269(Cell Physiol. 38):C892-C898.
68. Delgado-Coello, B. and Mas-Oliva, J. 1996. Lead affects the formation of the phosphorylated intermediate on the $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ -ATPase from human erythrocytes. *Medical Science Research* 24(3):159-161.
69. Philip L. Pokorski, Michael J. McCabe Jr. and Joel G. Pounds. 1999. Lead inhibits meso-2,3-dimercaptosuccinic acid induced calcium

- transients in cultured rhesus monkey kidney cells. *Toxicology* 134(1):19-26.
70. Philip L. Pokorski, Michael J., McCabe Jr. and Joel G. Pounds. 1999. meso-2,3-Dimercaptosuccinic acid induces calcium transients in cultured rhesus monkey kidney cells. *Toxicology* 138(2):81-91.
71. Evelyn Tiffani-Castiglioni, Marie E. Legare, Lora A. Schneider, William H. Hanneman, Elisabeth Zenger and Sandra J. Hong. 1999. The Role of Glia in Neurotoxicity. Michael Aschner and Harold K. Kimelberg (Ed.). Chapter 9, Astroglia and Lead Neurotoxicity, pp 175-199.
72. J.V. Calderón-Salinas, M.A. Quintanar-Escorza, C.E. Hernández-Luna y M.T. González-Martínez. 1999. Effect of lead on the calcium transport in human erythrocyte. *Human & Experimental Toxicology* 18(3):146-153.
73. J.V. Calderón-Salinas, M.A. Quintanar-Escorcia, M.T. González-Martínez y C.E. Hernández-Luna. 1999. Lead and calcium transport in human erythrocyte 18(5):327-332.
74. Y. Qiana, E.D. Harrisb, Y. Zhenga and E. Tiffany-Castiglioni. 2000. Lead Targets GRP78, a Molecular Chaperone, in C6 Rat Glioma Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 163(3):260-266.
75. Juan Santiago-García, Blanca A. Delgado-Coello and Jaime Mas-Oliva. 2000. Thermal analysis of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Molecular and Cellular Biochemistry* 209:105-112.

76. Ferguson C, Kern M and Audesirk G. 2000. Nanomolar concentrations of inorganic lead increase Ca^{2+} efflux and decrease intracellular free Ca^{2+} ion concentrations in cultured rat hippocampal neurons by a calmodulin-dependent mechanism. *Neurotoxicology* 21 (3):365-378.
77. Dave Campagna, Guy Huel, Georgette Hellier, Françoise Girard, Josiane Sahuquillo, Anne Fagot-Campagna, Jean Godin, and Philippe Blot. 2000. Negative relationships between erythrocyte Ca-pump activity and lead levels in mothers and newborns. *Life Sciences* 68:203-215.
78. M. Maldonado Vega, J. Cerbón Solórzano, and J.V. Calderón Salinas. 2002. The effects of dietary calcium during lactation on lead in bone mobilization: implications for toxicology. *Human & Experimental Toxicology* 21(8):409-414.
79. Yongchang Qian and Evelyn Tiffany-Castiglioni. 2003. Lead-Induced Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Responses in the Nervous System. *Neurochemical Research* 28(1):153-162.
80. Sivaprasad R, Nagaraj M, Varalakshmi P. 2003. Combined efficacies of lipoic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid on lead-induced erythrocyte membrane lipid peroxidation and antioxidant status in rats. *Human & Experimental Toxicology* 22(4):183-192.

81. K.D. Gill, Vandana Gupta and Rajat Sandhir. 2003. Ca^{2+} /calmodulin-mediated neurotransmitter release and neurobehavioural deficits following lead exposure. *Cell Biochemistry and Function* 21:345-353.
82. Gerald J. Audeserik and Ronald B. Tjalkens. 2004. In Vitro Neurotoxicology. Principles and Challenges. Series: Methods in Pharmacology and Toxicology. Tiffany-Castiglioni, Evelyn (Ed.) 2004, 352p. 88 illus., 6 in color. Chapter 4. In Vitro Studies of Neurotoxicant Effects on Cellular Homeostasis pp 59-93.
83. Daniela S. Kempe, Philipp A. Lang, Kerstin Eisele, Barbara A. Klarl, Thomas Wieder, Stephan M. Huber, Christophe Duranton, and Florian Lang. 2005. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288:C396-C402.
84. Quintanar Escorza, M.A. y Calderón Salinas, J.V. 2005. Efectos de la exposición a plomo en los mecanismos moleculares del transporte de calcio y morfología de eritrocitos humanos. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. 13 al 18 noviembre 2005; Oaxaca, Oaxaca.
85. Blanca Delgado-Coello, Raquel Trejo and Jaime Mas-Oliva. 2006. Is there a specific role for the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in the hepatocyte?. *Molecular and Cellular Biochemistry* 285(1-2):1-15.

86. M.A. Quintana-Escorza, M.T. González-Martínez, L. Navarro, M. Maldonado, B. Arévalo and J.V. Calderón-Salinas. 2006. Intracellular free calcium concentration and calcium transport in human erythrocytes of lead-exposed workers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 220(1):1-8
87. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, 582p.. Available from www.atsdd.cdc.gov/toxprofiles-tp13.pdf

ACTUALIZACIÓN

El plomo es uno de los metales pesados más abundantes en la tierra, y ha sido ampliamente usado a través de la historia de la humanidad. Esto representa un serio problema de salud, sobre todo para poblaciones susceptibles como la población infantil (46) y desde luego, la de los trabajadores expuestos al plomo en sus lugares de labor.

El plomo es uno de los agentes tóxicos más peligrosos para los organismos vivos. En humanos, niveles elevados de plomo han sido relacionados a un gran número de desordenes, para los cuales, se han propuesto varios mecanismos moleculares. Sin embargo, ninguno de estos mecanismos han sido completamente definidos: realmente son pocos los trabajos dedicados a esclarecer cómo el envenenamiento con plomo (o “saturnismo”) actúa a nivel molecular.

La detección y prevención de la toxicidad por plomo, ha sido una prioridad internacional en la salud pública. Aunque la exposición a dicho metal ha bajado durante las últimas tres décadas con la introducción de pinturas con bajo contenido de plomo, petróleo sin dicho elemento y mediante la prohibición de las soldaduras de plomo en latas de alimentos, se han mantenido niveles significativos de exposición subclínica. Además, nuevos orígenes de exposición están emergiendo, como el uso de medicinas tradicionales usadas en muchos países, incluyendo Asia, Europa y América (50).

En México, el problema de intoxicación por plomo sigue vigente en varias ciudades del país, y aunque los niveles de plomo en sangre están por debajo de la

norma de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, USA.), el sector de la población más afectada es el de mujeres primigestas (46 - 48).

Hay, por ejemplo, evidencias de la presencia de desarrollo intelectual reducido en niños con exposiciones prenatales al plomo. La exposición al plomo alrededor de las 28 semanas de gestación, es un período crítico para el desarrollo intelectual posterior del niño, con efectos duraderos y posiblemente permanentes. No existe evidencia de **umbral toxicológico**; los efectos del plomo más fuertes en el coeficiente intelectual (IQ) se presentan con los primeros microgramos de plomo en sangre. Los límites de acción actual del CDC para niños aplicados a mujeres embarazadas, permiten la disminución del coeficiente intelectual asociado al plomo. Las exposiciones postnatales bajas al plomo están asociadas con un desarrollo intelectual pobre en los niños; sin embargo, los efectos de la exposición postnatal no han sido ampliamente estudiados (49, 50).

De este modo, como hemos visto, los efectos adversos a la salud asociados con niveles elevados de plomo en sangre han sido ampliamente estudiados y documentados.

Así, hemos podido saber, por ejemplo, que entre 1960 y 1990 los índices de los niveles de plomo en sangre fueron reducidos de 60 µg/dl a 25 µg/dl para intervención individual en niños (estos índices representan el umbral de disparo de las actividades de emergencia encaminadas a disminuir los niveles plomo en sangre asociadas a las poblaciones afectadas). En 1991 los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de Norteamérica, recomendó bajar el nivel para intervención individual a **15 µg/dl**, e implementaron actividades primarias de prevención de envenenamiento por plomo en todas las

comunidades cuyas áreas incluían muchos niños con niveles de plomo en sangre >10 µg/dl. Surgieron algunas actividades como tomar cursos de historia ambiental, educación para padres acerca del plomo, y llevar un estricto monitoreo de la población de niños con niveles de plomo en sangre >10 µg/dl (50). Sin embargo, éste nivel 10 µg/dl, el cual fue originalmente tomado como patrón y como el disparador en todas las comunidades de las actividades de prevención, ha sido frecuentemente mal interpretado como un **umbral** toxicológico definitivo (49). Prueba de ello, es que a pesar de estos cambios, se han reportado efectos subclínicos de la exposición al plomo a niveles <10 µg/dl de plomo en sangre (46).

Estudios epidemiológicos recientes han informado que los bajos niveles de exposición al plomo tiene una asociación gradual con varias enfermedades resultantes tales como la hipertensión, enfermedades de las arterias periféricas, enfermedades renales, enfermedades neurodegenerativas e impedimento cognoscitivo. Aunque todas estas enfermedades incluyan componentes de tensión oxidativa, la relevancia de dicha tensión en las enfermedades relacionadas con la exposición a niveles bajos de plomo, ha sido criticada porque los estudios de los mecanismos se han conducido a niveles que no representan los observados típicamente en la población en general (88).

Estas críticas crean la necesidad de realizar estudios a los niveles reales de toxicidad de las poblaciones afectadas. También hay que decir que este hecho reafirma la validez actual de nuestros estudios realizados en el modelo ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) de eritrocitos humanos, los cuales reafirmaban ya la importancia de los efectos a niveles bajos de plomo.

El plomo (Pb^{2+}) ha sido y sigue siendo usado por el hombre para muchos

propósitos tecnológicos, siendo esta la principal razón de su amplia distribución. A pesar de que se han tomado acciones para disminuir el uso y la distribución del plomo, este sigue representando un peligro significativo para la salud.

El mecanismo tóxico del plomo es causado por su habilidad para substituir otros cationes polivalentes (particularmente cationes divalentes, como calcio $[Ca^{2+}]$ y zinc $[Zn^{2+}]$) en la maquinaria molecular de los organismos vivos. Estas interacciones le permiten al plomo afectar diferentes procesos biológicamente significativos, incluyendo transporte de metales, metabolismo energético, apoptosis, conducción iónica, adhesión celular, señalización inter e intracelular, procesos enzimáticos diversos, maduración de la proteína, y regulación genética. Los canales iónicos de la membrana y las moléculas de señalización, parecen ser uno de los blancos moleculares más relevantes que contribuyen a la neurotoxicidad del plomo; el sistema nervioso central en desarrollo es particularmente susceptible. En los momentos críticos del desarrollo, el plomo puede tener una influencia a largo plazo durante y más allá de la adolescencia. El envenenamiento de plomo pediátrico es más común que el envenenamiento de plomo en adultos, y sus efectos pueden ocurrir en los niveles de sangre reducidos con síntomas subclínicos. Esto obliga a una mayor atención por parte de los médicos al tratar a los pacientes pediátricos. Además, los efectos a largo plazo del envenenamiento por plomo pueden producir impedimento cognoscitivo y motor, con alteraciones en el comportamiento (46-48).

La gran variedad y efectos del plomo en la salud han llevado a investigar la relación entre la exposición del plomo y un gran número de síntomas clínicos del

envenenamiento por plomo; sin embargo, pocos trabajos se han enfocado en dilucidar cómo el envenenamiento por plomo actúa a nivel molecular. Se sabe que el plomo y sus derivados atacan muchas partes del organismo conforme prosiguen a través de los canales biológicos de calcio, zinc, magnesio o hierro.

En lo que se refiere a los complejos de Pb^{2+} , estos exhiben un par metálico solitario en cualquiera de los dos caracteres, ya sea holo o hemidirigido (54).

Una característica de este complejo es el denominado *efecto de par inerte*. Este término se refiere a la resistencia del par de electrones externos en Pb^{2+} a ser removido o a participar en la formación de un enlace covalente o de puentes de hidrógeno, dando como resultado un par de electrones externo, solitario, estable y relativamente inerte. Este par de electrones solitario puede producir la distribución de una carga no esférica alrededor del catión Pb^{2+} , es decir, la disposición de los ligantes alrededor del catión resulta en un hueco notable, lo que da evidencia de una actividad electroquímica de dicho par de electrones. De acuerdo a estas observaciones, Shimoni-Livny et al., 1998 (53), clasifican la geometría de coordinación alrededor del plomo en dos categorías estructurales: holodirigida y hemidirigida. En la primera, los enlaces con los átomos del ligante están distribuidos esféricamente alrededor del metal y, por tanto, la actividad del par solitario es menos evidente; mientras que en la segunda, los enlaces con el ligante se distribuyen solamente en una parte de la esfera de coordinación del metal, formando el hueco en la esfera de coordinación (53).

La Calmodulina, por su parte, es una proteína enlazadora de Ca^{2+} envuelta en procesos tales como mitosis y crecimiento celular, neurotransmisión, y

regulación de la bomba de calcio. Esta proteína es un ejemplo prototípico y bien estudiado de las proteínas de la familia de mano E-F (EF Hand-like) sensibles al Ca^{2+} . Ésta regula los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular en tres vías diferentes: a nivel celular, dirigiendo su distribución subcelular, a nivel molecular, promoviendo diferentes modos de asociación con muchas proteínas blanco, y dirigiendo una variedad de estados conformacionales en la calmodulina que resulten en la activación de las proteínas blanco. La regulación dependiente de calmodulina de las proteínas quinasa (cinasa), ilustra los mecanismos de potencial mediante el cual las proteínas sensibles al Ca^{2+} pueden reconocer y generar la afinidad y especificidad para los efectores (frecuentemente una enzima que convierte una molécula precursora inactiva en un mensajero secundario activo) en una manera dependiente de Ca^{2+} (54,55).

La Calmodulina está sujeta a la sustitución del plomo (Pb^{2+}). Esta posee 4 sitios idénticos en los cuales enlaza cationes Ca^{2+} secuencialmente. La sustitución del Ca^{2+} induce algunas distorsiones estructurales en el complejo, pero las coordenadas numéricas del catión no cambian. La estructura holodirigida nativa se vuelve algo hemidirigida. La perturbación resultante en la proteína puede no ser bastante fuerte para inhibir completamente su actividad bioquímica (52).

Nuestros resultados indican un marcado efecto inhibitorio del ion plomo sobre la bomba de calcio de eritrocitos humanos, sistema considerado importante en la regulación de la homeóstasis del calcio, no solamente del eritrocito, sino también de una gran variedad de células tanto animales como vegetales.

El presente estudio, constituye un esfuerzo para ayudar a definir los efectos

moleculares del ion Pb^{2+} sobre la función cinética de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) asociada al transporte de calcio de la membrana plasmática del eritrocito (a niveles de activación probablemente existentes en poblaciones expuestas a niveles bajos de plomo), así como a contribuir al mejor entendimiento de la fisiopatología de estas células al ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de regulación de la asociación entre ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) y el complejo calcio / calmodulina.

PERSPECTIVAS

En 1985, dentro del contexto de la carencia de investigaciones sobre los efectos de los metales pesados en la bomba de calcio de los eritrocitos humanos y dado el problema de contaminación ambiental por plomo (19, 20, 21), realicé un estudio sobre el efecto de metales pesados [Pb^{2+}] titulado “Regulación de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) de eritrocitos humanos por metales pesados” (57, 58). Partiendo del hecho de que los procesos moleculares de la relación ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+})-Calmodulina no habían sido aún determinados, dicho trabajo no sólo constituyó un esfuerzo para conocer los efectos moleculares del ion Pb^{2+} sobre la función cinética de la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) asociada al transporte de calcio de la membrana plasmática del eritrocito, sino que también contribuyó al mejor entendimiento de la fisiopatología de estas células, al definir los mecanismos de regulación de la asociación entre ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) y el complejo calcio/calmodulina. Ya en esa fecha sostenía, basado en los datos experimentales obtenidos en el laboratorio, la existencia de dos acciones bien definidas del ion Pb^{2+} sobre la ATPasa (Ca^{2+} , Mg^{2+}) plasmalemal. La primera se trata de una cooperatividad a través de la interacción del plomo ($< 1.0 \mu\text{M}$) y el calcio sobre la proteína reguladora calmodulina, y la segunda, una acción inhibitoria del plomo ($> 1.0 \mu\text{M}$) a través de la interacción con los grupos sulfhidrilo esenciales de la enzima (57, 58).

Hoy, a la luz de nuevos estudios, se ha verificado la existencia de estas acciones (65, 66, 74, 77, 81), por lo que mis aportaciones han contribuido al campo de la investigación de la toxicidad por metales pesados. El establecimiento

de estas dos diferentes acciones [cooperatividad e inhibición] llegaron a servir como base fundamental para investigaciones posteriores (59-81, 86).

Estos resultados han servido también como fundamento experimental en el desarrollo metodológico en diferentes campos y sistemas de investigación enfocados a definir la toxicidad del plomo y otros metales pesados. En la gran mayoría de las investigaciones, las cuales hacen referencia a las acciones establecidas por el trabajo original (57), nuestros resultados son usados o bien como referencia, fundamentando el conocimiento básico para desarrollar la metodología (59,60,68), o bien como punto de discusión para el esclarecimiento de dichos valores experimentales [cooperatividad a través de la interacción del plomo ($< 1.0 \mu\text{M}$) y el calcio sobre la proteína reguladora calmodulina]. Todas ellas ratifican nuestros resultados, siendo comparados con los obtenidos en otros modelos de estudio (64,67,72,75,76,80,83), o bien utilizándolos como fundamento teórico en el desarrollo de su experimentación, soporte y confirmación de sus propios resultados [acción inhibitoria del plomo ($> 1.0 \mu\text{M}$) a través de la interacción con los grupos sulfhídricos esenciales de la enzima] (62,65,70,72, 76,77,79,80, 81, 82,83,85,86).

A diferencia de nuestros resultados, en el trabajo realizado en ATPasa- Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico, y titulado "Inhibition of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase Activity by Cadmium, Lead and Mercury", no se registró ninguna

estimulación a concentraciones bajas de metales pesados del complejo ATPasa (Ca²⁺, Mg²⁺)-Calmodulina (62).

Entonces, este trabajo no únicamente deposita su valor en los descubrimientos y propuestas científicas que con el tiempo han sido corroboradas, sino que tiene implicaciones directas y fundamentales en el sector salud. Hoy, en varios países se están retomando las acciones necesarias para evitar la exposición a niveles bajos de plomo, al igual que veinticinco años atrás se hacía para abatir los altísimos niveles de contaminación y exposición al plomo. Sin embargo, hoy sabemos que a niveles bajos de plomo persisten poblaciones afectadas por dichos grados de contaminación (77). En los últimos años se han elaborado programas de protección y prevención para evitar la exposición a concentraciones bajas de plomo (46-52,87). Así, podemos verificar cómo las concentraciones de plomo establecidas en nuestros estudios han sido enfatizadas en muchas investigaciones posteriores (77,81), lo que ratifica la importancia y vigencia de las mismas, al igual que la vigencia de nuestro modelo experimental.

De esta manera y en síntesis, los resultados obtenidos en este trabajo, y el sistema experimental utilizado, han contribuido considerablemente en el desarrollo de la investigación de la toxicidad del plomo.

******* La bibliografía referida en la sección de Actualización y Perspectivas ha sido adjunta a la bibliografía del trabajo original; la sección de actualización corresponde de la referencia número 46 a la 56, y la de la sección de perspectivas de la referencia 57 en adelante. [INDICE*](#)

AGRADECIMIENTO FINAL

Sin nada más que gracias a todas las personas que estuvieron involucradas en esta etapa final (dentro y fuera); a los que estuvieron al inicio de este proceso, y a los ausentes que también contribuyeron con su fuerza inherente. Para mi padre, mi madre, y mi hijo, con énfasis. [INDICE](#)