

LOS EFECTOS TOXICOS DEL PLOMO EN NEURONAS PUEDEN SER REVERTIDOS POR EL DMPS

*Dr. Juan Bernal Martínez/Profesor Investigador/Departamento de Medicina, Centro Biomédico
Universidad Autónoma de Aguascalientes/Programa de Investigaciones Biomédicas Básicas*

*Dr. Francisco Gutiérrez Vázquez/Estudiante tesista de postgrado/Departamento de Farmacología y Toxicología
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N./Programa de Investigaciones Biomédicas Básicas*

34

PROYECTO DE INVESTIGACION:

PIBB-91-5: Estudio de los efectos nocivos de la intoxicación aguda por plomo sobre las propiedades eléctricas de células con distinto origen filogenético: protozoarios y células nerviosas de invertebrados.

IDEAS QUE DEBEN DESTACARSE:

- 1.- El plomo es un agente tóxico que afecta a todos los seres vivos, incluyendo protozoarios, invertebrados y mamíferos.
- 2.- En el ser humano, el plomo afecta el sistema nervioso, y tales efectos son más marcados e irreversibles en niños, produciéndoles trastornos del aprendizaje y de la conducta.
- 3.- Se requiere de nuevos fármacos que puedan usarse en el tratamiento de la intoxicación por plomo en humanos y de los cuales se conozca su acción a nivel celular y subcelular.
- 4.- En este trabajo se proporciona evidencia experimental de la acción del DMPS como antídoto de la intoxicación por plomo a nivel neuronal.

RESUMEN:

La intoxicación por plomo es un problema que afecta a todos los seres vivos. En el ser humano, los más afectados son los niños en edad temprana, produciéndoles importantes alteraciones neurológicas y del aprendizaje. El tratamiento de la intoxicación por plomo es aún controversial, ya que muchos de los compuestos comúnmente usados presentan efectos colaterales adversos. En este trabajo evaluamos la hipótesis de que el plomo afecta el funcionamiento de neuronas alterando la permeabilidad iónica del calcio y que este efecto del plomo puede ser prevenido con el DMPS, agente quelante de metales pesados que tiene un uso potencial en humanos. Se encontró que el plomo disminuyó la duración del potencial de acción cálcico (PACa_2^+) en forma dependiente de la dosis usada (1-100 μM). El efecto del plomo (50 μM) sobre las neuronas fue abolido cuando la preparación se perfundió con una solución de Pb_2^+ -DMPS. Cuando el plomo se inyectó intracelularmente a presión, también disminuyó la duración del PACa_2^+ en un 45%. El DMPS (150 μM) perfundido extracelularmente revirtió el efecto del plomo aplicado intracelularmente. Estos resultados indican que el plomo afecta las funciones neuronales,

disminuyendo la permeabilidad al calcio y proporciona evidencia experimental que fundamenta el uso del DMPS como antídoto en el tratamiento de la intoxicación por plomo.

INTRODUCCION:

El plomo es un metal pesado que se presenta como agente contaminante en poblaciones con alto grado de industrialización y alto índice de circulación vehicular, así como también en zonas rurales y suburbanas, constituyendo esto un problema de salud pública (Nriagu, 1990). En diversos estudios experimentales realizados tanto en animales como en humanos, se ha encontrado que el plomo puede alterar el sistema nervioso central y periférico. Puede causar importantes trastornos neuroconductuales, neurofisiológicos y del aprendizaje, fundamentalmente en niños en desarrollo. (Audesirk, 1985; Davis y cols., 1990; Bressler y Goldstein, 1991; Needleman, 1991). Al parecer, los efectos del plomo sobre las células nerviosas, se deben fundamentalmente a la capacidad que tiene este metal para alterar las propiedades intrínsecas de la membrana celular (Audesirk, 1985). Existen proteínas de membranas que actúan como poros selectivos, los cuales reciben el nombre de canales iónicos. Dentro de dichos canales iónicos, se encuentran los canales de calcio, cuya activación depende del voltaje de membrana. Estos canales regulan el flujo del calcio del exterior hacia el interior de la célula, modulando en forma directa o indirecta importantes funciones celulares, tales como la contracción muscular, la secreción de hormonas y neurotransmisores, la frecuencia y codificación de potenciales de acción, así como la apertura y cierre de otros canales iónicos. (Tsien y cols., 1987; Bean, 1989; Hess 1990).

Se ha propuesto que el plomo modifica las propiedades de la membrana celular, afectando específicamente la permeabilidad del canal de calcio dependiente de voltaje (Audesirk 1987; Busselberg y cols., 1990; Audesirk y Audesirk, 1991; Evans y cols., 1991).

El tratamiento de la intoxicación por plomo con el uso de agentes farmacológicos, es aún controversial, ya que muchos de los compuestos usados clínicamente están asociados a efectos colaterales indeseables (Aposhian y Aposhian, 1990; Klaassen, 1980).

A partir de los trabajos iniciados por Petrunkin (1956)

quien sintetizó el ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS), se han acumulado distintas evidencias experimentales, las cuales apoyan la hipótesis de que el DMPS resulta ser el compuesto ideal para tratar la intoxicación por metales pesados, particularmente producida por el plomo, arsénico y mercurio (Aposhian 1983; Maehashi y Murata, 1986; Aposhian y Aposhian, 1990). El DMPS es un compuesto químico análogo del BAL (British anti-lewisite), el cual presenta la característica de ser soluble en agua, ser de baja toxicidad y tener capacidad para absorberse cuando se administra por vía oral (Petrunkin, 1956, Aposhian, 1983; Aposhian y Aposhian, 1990). El DMPS tiene la capacidad para cruzar la membrana celular de los hepatocitos, favoreciendo la eliminación de altas concentraciones de metales pesados por la bilis y por heces fecales (Maiorino y Aposhian, 1985; Maehashi y Murata, 1985).

En este trabajo nos propusimos evaluar la hipótesis de que el plomo afecta al canal de calcio de neuronas y que dicho efecto puede ser revertido por la acción de compuestos quelantes de metales pesados tales como el DMPS.

Algunos resultados preliminares de este trabajo se han presentado en forma de resumen en congresos nacionales e internacionales (Gutiérrez y Bernal, 1993a y 1993b).

MATERIAL Y METODOS:

A).- Preparación biológica

La preparación biológica que se usó en el desarrollo del presente trabajo fue el ganglio periesofágico del caracol de jardín *Helix aspersa*. El "cerebro" de este molusco tiene neuronas gigantes (de 100 a 300 μm de diámetro), las cuales presentan un cuerpo neuronal esférico; esto permite su fácil identificación en diagramas como el que se muestra en la figura 1 (Kerkut y col. 1975). Estas neuronas pueden penetrarse con más de un microelectrodo y monitorear sus señales eléctricas. Además de lo anterior, otra ventaja de trabajar con este sistema biológico es que las neuronas no requieren un control riguroso de temperatura ni oxigenación especial, como es el caso de las células nerviosas de mamíferos.

La masa ganglionar periesofágica se fijó en una cámara de registro y se bañó con solución Ringer normal para caracol (ver solución 1, tabla 1). Antes de realizar el registro intracelular de las neuronas, la masa ganglionar se bañó en una solución que tiene una alta concentración de calcio y distintos compuestos que bloquean corrientes de potasio y sodio (ver solución 2, tabla 1), permitiendo de esta manera aislar la señal eléctrica dada únicamente por la activación del canal de calcio dependiente de voltaje.

B).- Microelectrodos para registro intracelular y microinyección

Los microelectrodos utilizados en los experimentos descritos en el presente trabajo, se fabricaron con capilares de vidrio de borosilicato de 2 mm de diámetro, con filamento interno. Los capilares se estiraron en un estirador vertical de pipetas modelo 700-C (David Kopf Ins.) Los microelectrodos se llenaron con cloruro de cesio (ver solución 3, tabla 1). La resistencia de los microelectrodos llenados con esta solución fluctuó entre 10 y 15 megaohms. Los microelectrodos utilizados para la microinyección del plomo fueron llenados con la solución 4, tabla 1 y posteriormente fueron biselados usando un biselado de pipetas marca Sutter Inst. Modelo BV-10.

C).- Dispositivo experimental de registro intracelular

Se realizaron experimentos de registro intracelular en donde se monitoreó el potencial de acción cálcico en condiciones control y cuando se perfundió la preparación con la solución extracelular (ver solución 2, tabla 1) a la cual se le agregó plomo y/o DMPS. Para lo anterior se usó un dispositivo experimental que consistió de los siguientes componentes: I) un preamplificador Dagan modelo 8500. II) un sistema de estimulación, registro y análisis de potenciales de acción consistente de una interface analógico-digital-digital-analógico marca Axon Instruments modelo TI-1-125 Khz y una computadora AT marca Gateway. La microinyección del plomo, se realizó con un sistema de microinyección a presión marca Picotspritzer, modelo P-II-220.

RESULTADOS

El plomo altera el canal de calcio de manera dependiente de la dosis

Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de plomo sobre el potencial de acción cálcico. Estos resultados se muestran en la figura 2. Se encontró que cuando se aplicó el plomo, la duración del potencial de acción cálcico se reduce en forma reversible y tal reducción es dependiente de la concentración de plomo usada.

Efecto del DMPS sobre la duración del potencial de acción cálcico de neuronas expuestas en forma aguda al plomo

El efecto del DMPS sobre la duración del potencial de acción cálcico de neuronas de *Helix aspersa*, expuestas en forma aguda al plomo, se muestra en la figura 3-a. Como se puede ver en esta gráfica, la duración del potencial de acción cálcico que tuvo un valor promedio de 1660ms, se redujo a 1200seg en un tiempo de exposición al plomo de 2.5 minutos. El porcentaje de reducción del potencial de acción fue de un 26.5% con respecto al valor control. A los 2 minutos de perfundir el DMPS a una concentración de 150 μM aún en presencia del acetato de plomo, la duración del potencial de acción se recuperó hasta tener una duración promedio de 1650ms, correspondiendo

este valor a un 99.4% del valor control. Este resultado nos sugiere que el DMPS es capaz de revertir el efecto que tiene el plomo sobre el potencial de acción cálcico.

Existen algunos estudios que indican que el DMPS es capaz de atravesar la membrana celular y quelar metales pesados dentro de la célula (Maiorino y Aposhian, 1985; Maiorino y cols., 1988), pudiendo, consecuentemente, revertir los efectos del plomo.

En este trabajo se probó la capacidad del DMPS para revertir el efecto que tiene el plomo sobre el potencial de acción cálcico, cuando éste es aplicado intracelularmente. Como se puede observar en la figura 3-B, inmediatamente después de la aplicación del pulso de presión que microinyecta el plomo intracelularmente, la duración del potencial de acción se reduce en un 38.46% con respecto a los valores iniciales tomados como control. Este efecto se mantiene durante 10 min. Después de pasado este tiempo, se inicia la perfusión del DMPS a una concentración de 150 μM y se observa que ocurre una recuperación con respecto a los valores iniciales tomados como controles.

DISCUSION:

En este trabajo se encontró que el plomo modifica la permeabilidad al calcio de neuronas de *Helix aspersa* y que tales efectos pueden ser revertidos por la administración extracelular del DMPS.

Los potenciales de acción de neuronas de *Helix aspersa* son el resultado de la activación de corrientes iónicas tales como la de sodio, calcio y potasio, las cuales subyacen a dichos potenciales de acción (Meech y Standen 1975; Akaike y cols., 1978; Adams y col., 1980; Standen, 1981). Con el propósito de tener una sola variable experimental en el desarrollo de los experimentos descritos en este trabajo, se usaron bloqueadores de canales de sodio y potasio (ver solución 2, tabla 1) para asegurar que la única variable a medir fuera la expresada por la activación del canal de calcio dependiente de voltaje (potenciales de acción cálcicos). En base a lo anterior, en este trabajo se muestra que el plomo es capaz de provocar en forma inmediata alteraciones del canal de calcio voltaje dependiente de neuronas de *Helix aspersa* las cuales son reversibles, puesto que cuando retiramos el plomo de nuestra solución de perfusión, las neuronas recuperan la capacidad para disparar potenciales de acción cálcicos de una duración similar al control (ver figura 2a; 3a y 3b). Resultados similares de los efectos del plomo sobre la permeabilidad del canal de calcio en neuronas han sido encontrados por otros autores (Buselberg y col., 1990; Evans y col., 1991; Audesirk y Audesirk, 1991).

Los resultados obtenidos sugieren que el plomo puede modificar un proceso extracelular, un proceso intracelular, o ambos, que están relacionados con la permeabilidad del canal de calcio que dependen del voltaje en las células nerviosas de

Helix aspersa. Todavía quedan distintos experimentos por realizar para identificar el sitio de acción del plomo sobre el canal de calcio o bien, sobre el posible segundo mensajero que es modificado por el plomo.

Otro de nuestros resultados en este trabajo es que el efecto del plomo es dependiente de la dosis (ver Fig. 2). Cuando utilizamos altas concentraciones de plomo por arriba de 100 μM llega un momento en que la célula pierde la capacidad para disparar potenciales de acción y luego muere. Nosotros pudimos comprobar este evento porque hay pérdida del potencial de membrana en reposo. Una explicación de este fenómeno es que altas concentraciones de plomo alteran la actividad de diversas proteínas cuya función es vital para la célula.

El DMPS es un compuesto químico dimercapto, que presenta dos grupos thiol, el cual se ha propuesto como una alternativa terapéutica en el tratamiento de la intoxicación por plomo en humanos (Petrunkin, 1956; Aposhian y cols. 1981; Aposhian, 1983; Aposhian y Aposhian, 1990). A pesar de lo anterior, no se conoce su posible acción protectora a nivel celular.

En nuestros experimentos, cuando expusimos la célula al efecto del plomo, observamos cómo la duración del potencial de acción cálcico se redujo, pero cuando se perfundió la solución que contenía DMPS-plomo, los efectos inicialmente producidos por el plomo sobre la duración del potencial de acción cálcico fueron abolidos hasta condiciones similares a la condición control (ver Fig. 3a). Este resultado nos sugiere que los efectos del plomo pueden ser revertidos por el DMPS. Lo anterior puede ser explicado si tomamos en cuenta que el DMPS presenta 2 grupos thiol ionizables, estos grupos le dan la capacidad para quelar el plomo, de una manera muy estable, atrapando el plomo libre y favoreciendo la separación del plomo, de los sitios a donde se encuentra unido.

Cuando evaluamos el efecto del plomo aplicado intracelularmente por microinyección sobre el potencial de acción cálcico, se observó una disminución de la duración de dicho potencial inmediatamente después de la microinyección. Sin embargo cuando perfundimos extracelularmente el DMPS, encontramos que se revirtió el efecto inicialmente producido por el plomo inyectado (ver Fig. 3b). Esto sugiere que el DMPS tiene la capacidad de atravesar la membrana celular e interiormente quelar el plomo. Similares resultados han sido encontrados por otros autores trabajando en preparaciones de animal integro (Aposhian y cols., 1981).

En conclusión, el plomo afecta el canal de calcio voltaje dependiente que subyace a los potenciales de acción cálcicos de neuronas de *Helix aspersa* de una manera reversible y dependiente de la dosis. El DMPS perfundido extracelularmente es capaz de revertir los efectos del plomo cuando éste se aplica extracelularmente o se inyecta intracelularmente. Por lo que podemos decir que el DMPS tiene capacidad para atravesar la membrana celular de las neuronas de *Helix aspersa* y protegerlas de la intoxicación por plomo.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, D.J., Smith, S.J. and Thompson, S.H. (1980). Ionic currents in molluscan soma. *Ann. Rev. Neurosci.* 3: 141-167.
- Akaike, N., Lee, K.S. and Brown, A.M. (1978). The calcium current of Helix neuron. *J. Gen. Physiol.* 71: pp. 509-531.
- Aposhian, H.V. and Aposhian, M.M. (1990). Meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid chemical, pharmacological and toxicological properties of an orally effective metal chelating agent. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 279-306.
- Aposhian, H.V. (1983) DMSA and DMPS-water soluble antidotes for heavy metal poisoning. *Annual Review of Pharmacol. Toxicol.* 23: 193-215.
- Aposhian, H.V., Tadlock, C.H., and Moon, T.E. (1981). Protection of mice against the lethal effects of sodium arsenite: a quantitative comparison of a number of chelating agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 61, 385-392.
- Audesirk, G. (1985). Effects of lead exposure on the physiology of neurons. *Progress in Neurobiology.* Vol. 24: 199-231.
- Audesirk, G. (1987). Effects of in vitro and in vivo lead exposure on voltage-dependent calcium channels in central neurons in *Limnaea stagnates*. *Neurotoxicology*; 4: 579-592.
- Audesirk, G. and Audesirk, T. (1991) Effects of inorganic lead on voltage-sensitive calcium channels in N1E-115 Neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*; 12: 519-528.
- Bean, B.P. (1989). Class of calcium channels in vertebrate cell. *Annu. Rev. Physiology* 51: 367-384.
- Bressler, J. and Goldstein, G.W. (1991) Mechanisms of lead neurotoxicity: Comentario; *Biochemical Pharmacology*; 41 (4): 479-484.
- Busselberg, D., Evans, M.L., Rahmann, H. and Carpenter, D. (1990). Lead inhibits the voltage-activated calcium current of *Aplysia* neurons. *Toxicology letters* 51-57.
- Davis, J.M., Otto, D.A., Weil, D.E., Grant, L.D. (1990) The comparative developmental neurotoxicity of lead in humans and animals. *Neurotoxicol. Teratol* 12: 215-229.
- Evans, M.L. Busselberg, D. and David, O. Carpenter. (1991) Pb+2 blocks calcium currents of cultured dorsal root ganglion cells. *Neuroscience Letters*, 129: 103-106.
- Gutiérrez, Francisco and Bernal, Juan. (1993a) Dimercapto compounds prevent acute lead effects L-type calcium channels. *Biophysical Journal*, Tu-pos416, A205.
- Gutiérrez, F. y Bernal, J. (1993b) Efecto del DMSA y DMPS sobre los canales de calcio de neuronas expuestas al plomo. XXXVI Congreso Nacional, Acapulco, Gro. México
- Hess, P. (1990). Calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Neuroscience* 25: 729-749.
- Klaassen, C.D. (1980). Heavy metals and heavy metal antagonist. In the pharmacological basis of therapeutics. (A. G. Gilman., L.S. Goodman and A. Gilman eds.) pp. 1615-1637. Macmillan Co. New York.
- Kerkut, G.A., Lambert, J.D.C., Gayton, R.J., Loker, J.E. and Walter, R.J. (1975). Mapping of nerve cells in the subesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 50-A, 1-28.
- Maeshasi, H. and Murata, Y (1986) Arsenic excretion after treatment of arsenic poisoning with DMSA or DMPS in mice. *Japan J. Pharmacol*, 40 188-190.
- Maiorino, R.M. and Aposhian, H.V. (1985) Dimercaptan metal-binding agents influence the biotransformation of arsenite in the rabbit. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77, 240-250.
- Maiorino, R.M., Weber, G.L., Aposhian, H.V. (1988) determination and metabolism of dithiol chelating agents III. Formation of oxidized metabolites of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid in rabbits. *Drug. Metab. Disp.* 16: 455-463.
- Meech, R.W. and Standen, N.B. (1975). Potassium activation in *Helix aspersa* neurons under voltage clamp: A component mediated by calcium influx. *J. Physiol.* 249, pp. 211-239.
- Needleman, H.L. (1991). The health effects of low exposure to lead. *Annu. Rev. Publ. Health.* 12: 111-140.
- Nriagu, O.J. (1990). Global metal pollution. *Environment* 32, 7: 7-32a.
- Petrunkin, V.E. (1956). Synthesis and properties of dimercapto derivatives of alkylsulfonic acids. 1: Sintesis of sodium 2,3-Dimercaptopropylsulfonate (unithiol) and sodium 2-Mercaptoethyl sulfonate. *Ukr. Khim. Zh* 22: 603-607.
- Standen, N.B. (1981). Ca channel inactivation by intracellular Ca inyeccion into *Helix* neuronas. *Nature* Vol. 293, pp. 253-368.
- Tsien, R.W., Hess, P., McCleskey, E.W. and Rosenberg, R.L. (1987). Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation and block. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16: 265-290.

Tabla 1.-COMPOSICION DE SOLUCIONES (mM)

Reactivo	Solución 1	Solución 2	Solución 3	Solución 4	Solución 5
NaCl	75				
KCl	4				
CaCl ₂	10	20			
MgCl ₂	5				
HEPES	5	5	5	5	5
TEA-Cl		70			70
4-AP	5				5
CsCl		5	150	150	5
Glucosa	5	5			5
BaCl ₂					20
Acetato de plomo				1.0	
Verde rápido				0.1	
pH	7.5	7.5	7.2	7.2	7.5

HEPES=Ac. N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico].
 TEA-Cl=Cloruro de tetraetilamonio.
 4-AP=4-Aminopiridina.

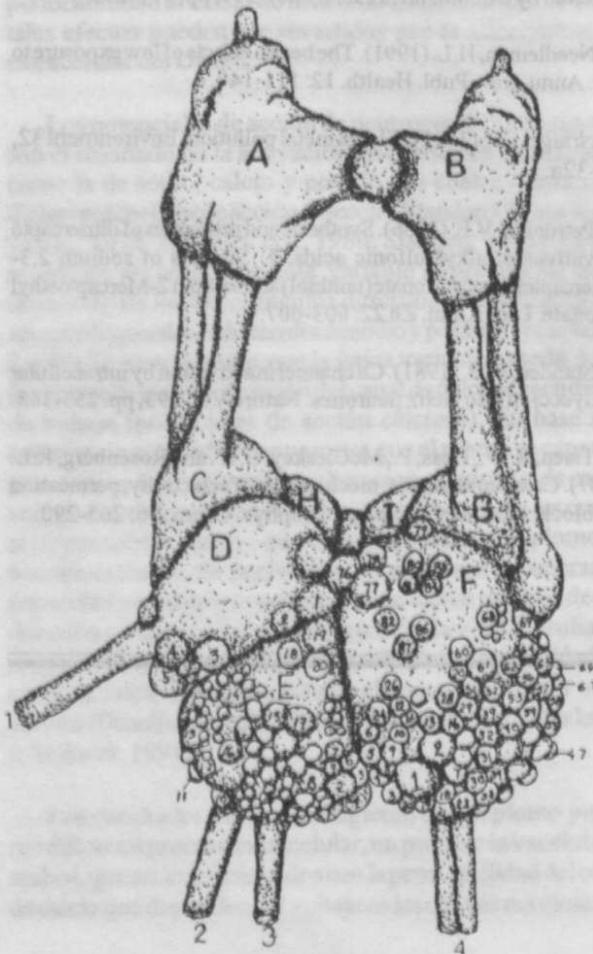


FIGURA 1. ESQUEMA DEL CEREBRO DEL CARACOL

Diagrama esquemático que muestra la masa ganglionar periesofágica del cerebro del caracol de jardín *Helix aspersa* (Kerkuty col. 1975). Las neuronas que se utilizaron en este trabajo fueron la 76 y 77F, 1 y 2 D.

FIGURA 2. EFECTO REVERSIBLE DEL PLOMO SOBRE EL POTENCIAL DE ACCION DE NEURONAS DE *Helix aspersa*:
A) En los 3 paneles, la primera línea corresponde a un registro del monitor de corriente, el segundo trazo corresponde al cero de voltaje, el tercer trazo corresponde al monitor de voltaje (los cambios en el monitor de voltaje corresponden a un potencial de acción cálcico). En este experimento se usó bario como acarreador de corriente (ver solución 5, tabla 1). **B)** La duración del potencial de acción cálcico (porcentaje del control) es graficada contra el tiempo (en minutos) en condiciones control y cuando la célula fue tratada con plomo (1, 10 y 50 μM) y después de que la célula fue lavada con una solución libre de plomo. Cada punto representa el promedio de 5 registros y la barra representa la desviación estándar.

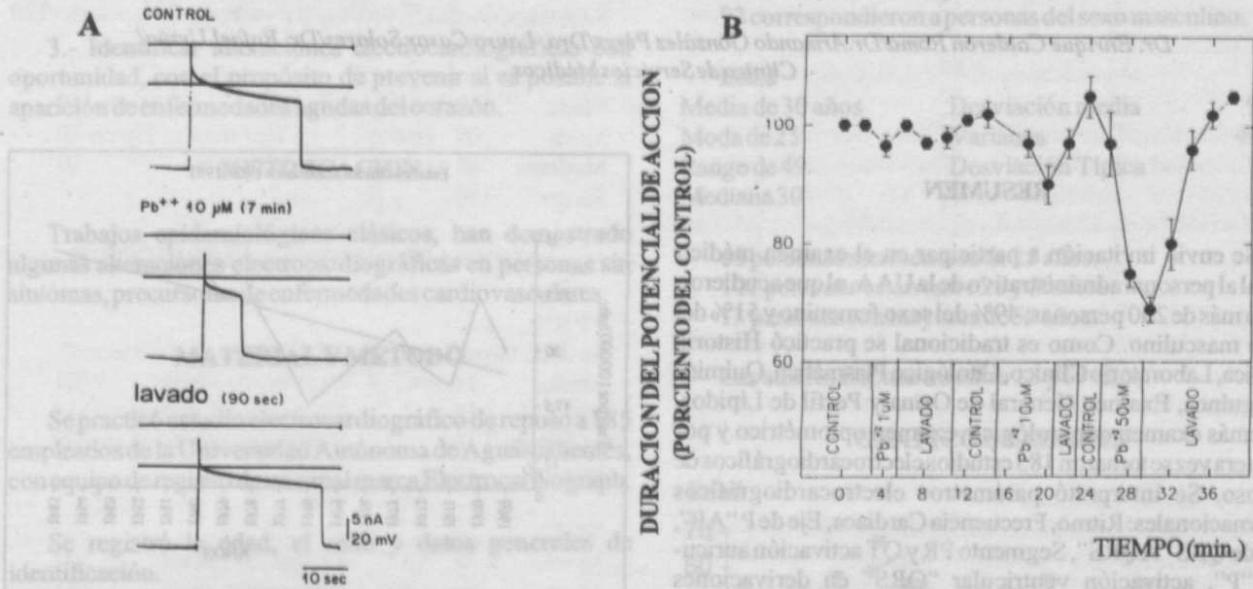


FIGURA 3. EFECTO DEL DMPS SOBRE EL POTENCIAL DE ACCION CALCICO DE NEURONAS EXPUESTAS EN FORMA AGUDA AL PLOMO: **A)** La duración del potencial de acción cálcico (en milisegundos) es graficada contra el tiempo (en min.) en condiciones control, cuando la célula fue perfundida extracelularmente con la solución conteniendo plomo (50 μM) y con plomo + DMPS. Cada punto representa el promedio de 5 potenciales de acción. **B)** La duración del potencial de acción cálcico (porcentaje del control) es graficada contra el tiempo (en min.) en condiciones control, cuando el plomo fue microinyectado en la célula mediante un pulso de presión y cuando fue tratada con DMPS (150 μM) perfundido extracelularmente. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos y la barra representa la desviación estándar.

