

MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES DE LA NEUROTOXICIDAD POR PLOMO

Aníbal Garza^{1,3}, Hortencia Chávez^{2,3}, Rosario Vega³, Enrique Soto³

SUMMARY

Lead, a heavy metal, has been used by humans for many technological aims, a fact that has determined its actual widespread distribution. Although various actions have been taken to diminish the use and distribution of lead in the environment, it remains a significant health problem. The evolution of technological processes applied in the industry has followed economic interest. It's only in recent times that criteria related to health and ecology have been considered while designing new industries. Particularly susceptible groups are children and workers involved in mining, metallurgy, paint manufacturing and battery recycling. The communities living in areas where those industries are settled have also a higher lead exposure risk. Its high biological toxicity has determined lead to become one of the most significant environmental contaminants with pathogenic potential for humans.

The toxic mechanism of lead is essentially due to its capability to substitute other polyvalent cations (particularly divalent cations such as calcium and zinc) into the molecular machinery of living organisms. Thanks to its ionic structure, lead establishes very favorable interactions, usually with higher affinity, with chemical groups that normally coordinate divalent cations in proteins. The coordination of cations in proteins is usually achieved by negatively charged acidic residues. These residues establish ionic interactions with the positively charged ion, resulting in a change in the structure and electric charge of the protein.

These interactions determine that lead may affect different biologically significant processes, including metal transporting proteins, ionic channels, cell adhesion molecules, diverse enzymes which have metallic cofactors, signaling molecules such as calmodulin and protein kinase C and DNA binding proteins, among other molecular targets.

Lead interactions with the coordinating amino acid residues in proteins may induce an abnormal conformational configuration of proteins, as compared to the conformational structure acquired when interacting with commonly active cations, thus significantly altering its functional properties in the very complex molecular machinery. Among the biologically active sites usually occupied by lead, those related to calcium seem to have the most significant pathological importance for lead toxicity due to their widespread distribution and highly significant functional relevance for the

normal cell function. Two of the principal calcium binding motifs in proteins, the EF-hand motif and the C2 motif, have an intrinsic high affinity for lead. In the case of EF-hand motifs, calmodulin is one of the most remarkable targets for lead due its importance in regulating cellular processes, being activated by lead at lower concentrations than required for calcium and displaying an abnormal activity. The C2 motif is expressed mainly in calcium dependent membrane associated proteins such as protein kinase C (PKC) or synaptotagmin. The principal characteristic in these motifs is an electrical change in the protein after the calcium binding, allowing its interaction with biological membranes. In synaptotagmin, according with the electrical characteristics of lead, the interaction of the complex lead-synaptotagmin with biological membranes is similar to the interaction calcium-synaptotagmin with membranes, which is eminently electrical. Hence, the conformation of this complex is probably different to the conformation with calcium, fact evidenced by the failure of lead-synaptotagmin to interact with other proteins of the exocytic machinery. In relation to lead neurotoxicity, membrane ionic channels seem to be among the most relevant molecular targets of lead. In particular, calcium and potassium channel function may be significantly impaired by lead, affecting the activation of calcium activated potassium channels, the inactivation process of calcium channels, and the ionic conductance of calcium channels. As occurs with other heavy metals, lead is capable of blocking the calcium channel, probably at the selectivity filter. The high affinity lead binding to the acidic residues of the filter provokes a slow flux of the metal through the channel pore, blocking the calcium conductance. The regulation of ionic channels will be significantly altered also. Calmodulin is a common calcium sensing protein for many ionic channels and its alteration by lead could affect the channel operation. Abnormal functioning of regulatory and signaling proteins such as calmodulin, protein kinase C and synaptotagmins, which normally require calcium for its activity, may also display an abnormal functioning, thus determining a widespread metabolic influence of lead poisoning.

Lead distributes evenly into the cell thus reaching intracellular organelles, including the endoplasmic reticulum, mitochondria and the cell nucleus. This results in significant alterations of intracellular calcium metabolism and regulation due in part to the malfunctioning of calcium channels and ionic pumps in plasma membrane, endoplasmic reticulum and mitochondria. Inadequate

¹Facultad de Medicina (Biomedicina); ²Facultad de Estomatología; ³Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla.
Correspondencia: Enrique Soto, Instituto de Fisiología BUAP, Apartado Postal 406, Puebla, Pue. 72000, México. Email: esoto@siu.buap.mx
Recibido: 24 de noviembre de 2004. Aceptado: 16 de diciembre de 2004.

energy generation due to mitochondrial damage and malfunctioning in cation dependent enzymes, alterations in protein folding due to the direct binding of lead to calcium activated reticular chaperones, or indirectly, altering the intrareticular calcium levels, and the disruption of the structure of DNA binding motifs such as zinc fingers, among others, promotes alterations in gene expression and DNA repair.

Lead poisoning is one of the most important chronic environmental illnesses affecting children in modern life. Developing central nervous system is particularly susceptible to lead toxicity. At critical times in development, lead may have a disorganizing influence with long-lasting effects which may continue into teenage and beyond. Mechanisms originating this disorganizing influence in the central nervous system are a consequence of the interaction of lead with various targets as previously described; alterations of cell molecular machinery, at the systems level induce excitotoxic phenomena, interferes with neurotransmission at neurotransmitter synthesis, release and receptor activation levels, alters intracellular signaling and produce cell membrane peroxidative damage. Compared to adult lead poisoning, pediatric lead is most common and its effects may occur at reduced blood levels with subclinical symptoms; thus a high index of suspicion is necessary for physicians when dealing with pediatric patients. Long-term effects of lead may produce cognitive and motor impairment, with behavioral alterations. The particular vulnerability of the immature nervous system to the lead poisoning is probably due to the fact that in this stage of development the establishment of appropriate neural networks is highly dependent on the synaptic activity, which in turn could be altered by lead.

Lead poisoning has been considered as a potential co-factor in complex neuropsychological alterations such as schizophrenia. In this sense it is worth to note the possibility that the physical and psychic symptoms of Vincent Van Gogh may have been due to chronic lead poisoning. The following are among the clinical symptoms described by Van Gogh in his autographed letters: initial debilitation, stomatitis with loss of teeth, recurring abdominal pains, anemia (with a "plumbic" skin tone), neuropathy of the radial and saturnine encephalopathy, including epileptic crises, progressive character changes and periods of delirium, all of which meet present criteria for diagnosis of Organic Mental Disorder due to cerebral lesion or somatic illness, and Organic Character Disorder (DSM-IV-R). Alpha-thujone, found in absinthe and in many popular herbal medicines, may also have contributed to Van Gogh symptoms since he was a well-known absynthe drinker.

Many countries, including Mexico, have implemented policies aimed to eliminate lead from the majority of their industrial processes. This has been carried out with considerable effort, and in some cases, with open confrontations between the scientific community and industrial sector. Although there have been actually significant advances to eliminate lead from many products (gasoline, painting manufacturing, etc.), lead is not degradable, thence once it is released in the environment it remains there for long periods of time. This implies that we should have to deal with lead poisoning in the years to come and to be aware of this diagnostic possibility in any suspicious case.

This review is centered in the description of the molecular mechanisms of lead toxicity and its repercussion in the cellular excitability and central nervous system function.

Key words: Lead, neurotoxicity, calcium-binding sites, ionic channels, calcium channels, neurotransmission.

RESUMEN

El plomo es un metal pesado que por años se ha utilizado en la industria con diversos fines, por lo que tiene una amplia distribución en el ambiente. Esto, aunado a su elevada toxicidad, lo ha convertido en uno de los principales contaminantes ambientales con potencial patológico al que está expuesta la población humana. Los principales grupos de riesgo son los niños y los trabajadores de las industrias minera y metalúrgica, y de la elaboración de pinturas y el reciclaje de baterías. Otro grupo de riesgo son las familias que habitan en las áreas donde se asientan dichas industrias. El principal mecanismo tóxico del plomo es la suplantación de cationes polivalentes (esencialmente calcio y zinc) en las maquinarias moleculares del organismo, lo cual es posible gracias a una estructura iónica que le permite establecer interacciones muy favorables con los grupos que coordinan los cationes polivalentes en las proteínas, en ocasiones con más afinidad que la del propio ion suplantado. Por medio de este mecanismo afecta las proteínas transportadoras para metales, canales iónicos, proteínas de adhesión celular, diversas enzimas metabólicas y proteínas de unión al ADN, entre otros blancos moleculares. Las diferencias en la forma en que interactúa el plomo con los grupos coordinantes de la proteína con respecto a los iones nativos, pueden propiciar la adopción de conformaciones anormales en las proteínas a las cuales se une el plomo, lo que repercute directamente sobre su funcionamiento. Entre los sitios de unión para cationes polivalentes ocupados por el plomo, los de unión a calcio parecen desempeñar un papel principal en su toxicidad debido a su importancia y amplia distribución en la fisiología celular. Muchas de las alteraciones ocasionadas por el plomo se relacionan con el metabolismo celular del calcio y los distintos procesos celulares que dependen de él.

Los canales iónicos de la membrana celular representan uno de los blancos moleculares de mayor importancia patogénica para el plomo, ya que de ellos depende el funcionamiento celular coordinado y podrían ser el origen de varios de los trastornos neuropsicológicos presentes en las intoxicaciones por plomo. Este metal afecta la activación, conductancia y regulación de distintos canales iónicos de manera directa o indirecta, siendo los canales de calcio y potasio dos de los más afectados. Asimismo, el funcionamiento anormal de proteínas reguladoras intracelulares como la calmodulina, proteína cinasa C y sinaptotagminas provoca que los efectos tóxicos del plomo se extiendan a un amplio sector de la maquinaria molecular de la célula. El plomo se distribuye en el interior de la célula, por lo que afecta organelas como el retículo endoplásmico, la mitocondria y el núcleo, lo que a su vez se traduce en alteraciones en la regulación intracelular del calcio, el ensamblaje de proteínas, la generación de energía y la regulación genética, entre otras. El sistema nervioso es especialmente susceptible a la acción del plomo, en particular durante sus etapas de maduración, lo que hace que los niños sean uno de los grupos poblacionales más vulnerables a una exposición a este metal. Los estragos ocasionados ocurren aun en niveles reducidos de plomo y, aunque son irreversibles, pueden pasar inadvertidos. Entre éstos se encuentran deficiencias cognitivas, motoras y conductuales, a la vez que podría ser cofactor de trastornos neuropsicológicos más complejos como la esquizofrenia. Entre los daños producidos en el Sistema Nervioso se encuentran la excitotoxicidad, la interferencia con la neurotransmisión y la señalización intracelular en distintos niveles, y daños peroxidativos en lípidos y proteínas. Esta revisión se centra en algunos de los mecanismos moleculares

implicados en la toxicidad del plomo y sus repercusiones en la fisiología celular, particularmente en lo relacionado con la excitabilidad celular.

Palabras clave: Plomo, neurotoxicidad, sitios de unión a cationes, canales de calcio, contaminación ambiental.

INTRODUCCIÓN

El ser humano, a diferencia de otras especies animales, carece de las adaptaciones fisiológicas necesarias para sobrevivir en muchos de los ambientes que a lo largo de su historia ha colonizado, por lo que su supervivencia depende únicamente de su habilidad para emplear y modificar los elementos de su entorno a fin de satisfacer sus necesidades materiales. Este proceso, al cual denominamos tecnología, ha sido la clave de la subsistencia de nuestra especie y la base de su desarrollo, y ha evitado el colapso poblacional al cual de otra forma habríamos llegado desde hace mucho tiempo. Sin embargo, el desarrollo tecnológico también ha traído consigo la generación de serios problemas de diversa índole. Dejando de lado sus aplicaciones militares (cuyo fin es deliberada y evidentemente destructivo), el mejor ejemplo de los efectos adversos de la tecnología son los daños ecológicos generados en el planeta en los últimos veinticinco años. En este periodo la evolución del proceso tecnológico ha obedecido tradicionalmente a intereses de tipo económico e industrial, y sólo hasta hace poco se han comenzado a tomar en cuenta criterios relacionados con la salud y la ecología. En consecuencia, gran parte de la industria emplea y libera hacia el ambiente elementos que pueden resultar nocivos para la vida. Ejemplo de las consecuencias de estos procesos es la actual problemática ambiental relacionada con el plomo y otros metales pesados empleados por distintas ramas de la industria a lo largo del siglo XX, y que aún en la actualidad se siguen empleando.

El plomo (Pb) es un metal que se ha utilizado ampliamente con diversos fines desde la prehistoria. Su ductilidad, alta densidad y poca reactividad química, así como su fácil extracción, relativa abundancia y bajo costo, lo hicieron materia prima o componente fundamental en diversos procesos tecnológicos. Se ha usado en la elaboración de medicinas, pinturas, tuberías, enseres diversos, municiones, vitrificado de cerámicas y, en épocas más recientes, en aleaciones para soldaduras, almacenaje de reactivos químicos, baterías eléctricas, protección contra radiaciones ionizantes y como aditivo antidetonante en gasolinas. Dado lo anterior no sorprende que, a raíz de la actividad humana, haya aumentado en forma importante la concentración de este metal en el medio ambiente y nuestra exposición al mismo.

Es un hecho que gran parte de los habitantes de las ciudades modernas está expuesta en forma crónica a niveles de plomo ambientales que, aunque reducidos en el mejor de los casos, podrían implicar un riesgo para la salud, principalmente del Sistema Nervioso (27, 42). Debido a su elevada toxicidad, la intoxicación aguda por plomo suele ser fácil de detectar gracias a la variedad de síntomas gastrointestinales, hematológicos, neurológicos y, en casos graves, renales que suelen acompañarla (19). Por el contrario, una intoxicación crónica y de bajo nivel como la que usualmente se encuentra en la población de las ciudades, representa un mayor desafío diagnóstico, ya que su sintomatología suele ser vaga y el grado de afectación puede variar entre los individuos, de los cuales los niños son un grupo especialmente vulnerable (4, 22).

Gran parte de los estragos que causa en la fisiología celular resultan de la sustitución que este metal realiza de diversos cationes polivalentes (calcio, zinc y magnesio, entre otros) en los sitios celulares de unión a iones (13). La amplia distribución que han tenido evolutivamente estos sitios en la maquinaria celular y la multiplicidad de funciones fisiológicas que se acoplan a ellos, han dificultado definir los blancos moleculares que de manera directa o indirecta participan en la patogenicidad del plomo. La facilidad con que este metal penetra y se distribuye en el organismo obedece a esta misma propiedad, ya que emplea, entre otros, los mecanismos de transporte para la absorción de calcio, zinc, magnesio y otros metales requeridos por el organismo (3, 19). Las vías seguidas por el plomo para su absorción dependen en algunos casos del compuesto específico de plomo del que se trate, siendo las más significativas las vías digestivas y pulmonares (19). Una vez en el torrente sanguíneo, la mayor parte del plomo se une a proteínas eritrocitarias o plasmáticas, quedando una pequeña porción en estado libre. Desde aquí se distribuye al resto de los tejidos, donde se acumula en mayor o menor medida (19).

Entre los sitios proteicos para cationes polivalentes que ocupa el plomo podemos mencionar los de unión a zinc, por los que el plomo tiene una afinidad muy elevada, y los de calcio, por los que si bien tiene una afinidad menor, sigue siendo más alta que la del propio calcio (13). Pese a ello, dada la amplia distribución e importancia que tienen estos últimos en la fisiología celular, actualmente se considera la sustitución de iones calcio en la maquinaria proteica como el principal mecanismo patogénico del plomo (22).

A lo largo de su evolución, los organismos han adaptado su maquinaria molecular para reconocer y utilizar los elementos químicos en cuya presencia han evolucionado. En el caso de los metales (sodio, potasio, magnesio, calcio, zinc, etc.) que el organismo puede

manejar como cationes libres, la maquinaria molecular logra diferenciarlos al establecer con ellos interacciones basadas en el reconocimiento de características específicas de cada ion (radio iónico, carga eléctrica, configuración electrónica, etc.), sin comprometer en ello la eficiencia funcional del sistema (5). Sin embargo, la posibilidad de diferenciar entre iones se pierde en presencia de dos o más iones distintos con interacciones análogas (5, 13), lo que permite que iones normalmente ausentes en los sistemas biológicos puedan usurpar estos sitios de unión —otro tipo específico— con distintas repercusiones para el metabolismo celular (13). Este mecanismo de toxicidad es compartido por diversos metales que resultan tóxicos para el organismo. La usurpación de los sitios de unión para calcio y zinc por el plomo son dos de los casos mejor estudiados.

Plomo y sitios de unión a calcio

Al ser el calcio un catión con carga positiva (Ca^{2+}), sus sitios de unión en las proteínas suelen estar conformados por agrupaciones de residuos cargados negativamente, en general aspartatos o glutamatos, ubicados de tal manera que establecen interacciones óptimas con el catión para el cual constituyen en conjunto una efectiva trampa molecular (21, 35). Para ello, los oxígenos (usualmente 6 o 7) provenientes de grupos carbioxilato o carbonilo de la proteína se disponen alrededor del calcio para conformar una esfera de coordinación para el catión (18, 21, 35). La arquitectura particular de este sitio determina la afinidad de la asociación del calcio con la molécula. La importancia de esta asociación radica en los cambios que ocasiona en las relaciones estructura-función de la proteína. El equilibrio de cargas eléctricas resultante de la interacción entre los oxígenos coordinantes (de carga negativa) y el ion coordinado (de carga positiva) reduce la carga neta de la proteína, lo que modifica sus interacciones electrostáticas con otras moléculas. Al mismo tiempo, al actuar el catión como un eslabón entre los diferentes grupos coordinantes, propicia que la proteína adquiera una estructura tal que éstos quedan confinados espacialmente a su alrededor, lo que a su vez se traduce en la adopción de una conformación determinada (21, 44). Si consideramos que el funcionamiento de las proteínas está definido por su estructura, para controlar la actividad de diferentes componentes celulares basta con regular la concentración y asociación de un ion específico con las proteínas capaces de albergarlo. La amplia difusión biológica que han tenido los sistemas de señalización por calcio son un ejemplo del éxito evolutivo de este mecanismo.

En el caso del plomo, también catión metálico divalente, sus características iónicas le permiten for-

mar interacciones con los sitios de unión para calcio de manera similar a como lo haría el ion nativo, pero estableciendo importantes diferencias que constituyen el fundamento de la toxicidad de este metal (8, 13). Al ser el radio iónico del plomo ligeramente superior y su electronegatividad considerablemente mayor a los del calcio, es capaz de establecer interacciones muy favorables con los grupos coordinantes en la proteína. Empero, al ser distinta su configuración electrónica, dicha asociación difiere espacialmente de la establecida por el calcio (13). A diferencia del calcio y del zinc, en los cuales las cargas eléctricas se distribuyen en forma esférica alrededor del ion y propician un arreglo regular de los grupos que lo coordinan en la proteína, en el caso del plomo la distribución de cargas tiende a ser irregular debido a la presencia de un par inerte de electrones en uno de sus orbitales (13). Esto se traduce en la disposición hemidireccional (hacia un solo lado) de los grupos de coordinación de la proteína, lo que altera su estructura (figura 1). Este efecto es más notorio en sitios con pocos grupos coordinantes para el metal, como es el caso de los que unen preferentemente al zinc (13, 39). Acorde con lo anterior, se ha observado que la activación por el plomo de muchas de las proteínas de unión a calcio suele ser anormal, por lo que exhibe una activación y un funcionamiento atípicos, los cuales pueden ser ocasionados por conformaciones no fisiológicas en la proteína tras su asociación al plomo (6, 47).

De la membrana al núcleo

Por su capacidad para sustituir el calcio y otros cationes divalentes en la maquinaria molecular, los efectos del plomo abarcan prácticamente la totalidad del ambiente celular, lo que permite rastrear sus secuelas desde la matriz extracelular hasta el núcleo. Si bien muchos de estos efectos son producto de la interacción directa del plomo con el componente celular en cuestión, otros son resultado del mal funcionamiento de procesos más complejos como la regulación genética, la síntesis de proteínas o el metabolismo energético, en los cuales el plomo altera la operación de alguno de sus componentes y amplifica con ello sus efectos a proteínas y sistemas que estructuralmente no son susceptibles a su acción. Es el caso, por ejemplo, de algunos proteoglicanos de la matriz extracelular (10) o de moléculas de adhesión/señalización intercelular como las NCAM (*Neuronal Cell Adhesion Molecules*), cuya síntesis y maduración conformacional son afectadas por el plomo (33).

En la membrana citoplasmática, además de causar daños peroxidativos en lípidos y proteínas (1, 45), el plomo afecta funcionalmente a proteínas extracelulares

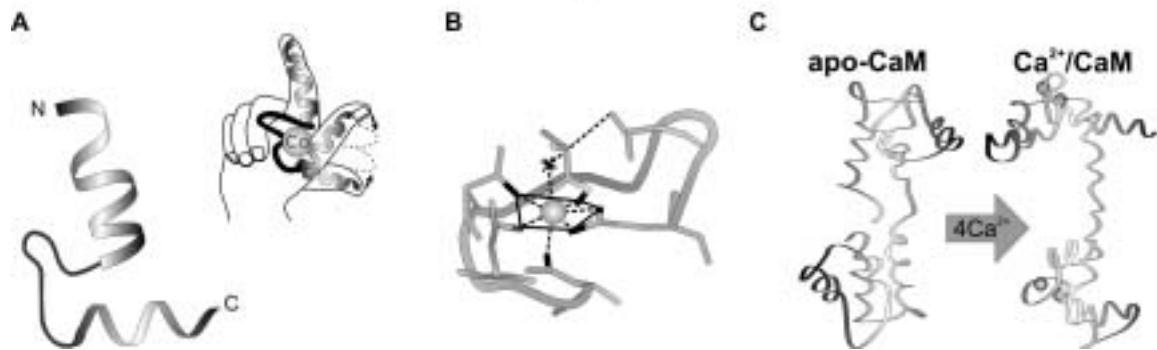


Fig. 1. Interacciones del calcio con los sitios de unión en proteínas. **A)** Estructura del motivo *mano EF* para la coordinación de calcio. El sitio de unión al calcio se forma por el lazo que conecta ambas hélices. Tras esta ocupación, las hélices cambian su posición relativa. El calcio está representado por el círculo gris (modificado de 7 y 21). **B)** Coordinación del calcio en un motivo EF por átomos de oxígeno (en negro). En la coordinación participa una molécula de agua representada por el asterisco. La geometría de coordinación en este caso es de una bipirámide pentagonal (modificado de 30). **C)** Cambio conformacional de la calmodulina (apo-CaM) tras la ocupación de los cuatro sitios de unión para calcio ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$). Se observa que la molécula se reacomoda en los extremos alrededor de los iones de Ca^{2+} (esferas) (modificado de 44).

de unión a calcio. Entre éstas se encuentran las caderinas, las cuales son moléculas de adhesión intercelular que presentan en su dominio extracelular múltiples sitios de unión a calcio cuya ocupación es necesaria para la estabilidad estructural de la proteína. La unión de cadmio (Cd^{2+}) y probablemente de plomo a estos sitios provoca una alteración conformacional que impide su funcionamiento, a la vez que activa, por medio de su dominio intracelular, diversas cascadas de señalización relacionadas con la expresión genética (33). También en la membrana celular diversos intercambiadores y transportadores para calcio y otros metales divalentes son afectados en mayor o menor medida por el plomo. Es el caso del DCT1 (*Divalent Cation Transporter Molecule 1*), transportador usado para la captura celular de metales, y que el plomo puede emplear como vía de entrada al citoplasma (3). Diversos canales iónicos, tanto activados por voltaje como por ligando, son susceptibles a la acción del plomo. Al ser estos canales la base de la excitabilidad celular, constituyen uno de los blancos patogénicos de mayor importancia para el organismo. Entre estos podemos mencionar el receptor glutamatérgico tipo N-metil-D-aspártico (NMDA) (15), algunos subtipos de canales de potasio activados por voltaje (23) o por calcio (20), receptores colinérgicos (28, 29) y, quizás el ejemplo mejor estudiado, canales de calcio activados por voltaje. Debido a su importante papel en el Sistema Nervioso, sobre estos últimos nos enfocaremos a continuación.

Canales de calcio y metales pesados

Los canales de calcio regulados por voltaje permiten el paso de una gran diversidad de cationes mono o

polivalentes de distintas especies, entre los que podemos mencionar el sodio (Na^+), litio (Li^+), potasio (K^+), cesio (Cs^+), calcio (Ca^{2+}), bario (Ba^{2+}) y estroncio (Sr^{2+}) (9,38). Tan amplia gama de permeabilidad se debe a la forma del poro del canal (figura 2). Este es de un diámetro y longitud suficientes para albergar en su interior más de un ion en forma simultánea, ya que presenta en su luz un filtro de selectividad flexible formado por cuatro residuos de glutamato, los cuales conforman en conjunto un sitio de unión de alta afinidad para cationes denominado *locus EEEE* (con base en la nomenclatura de una letra para los aminoácidos, en que la E representa al glutamato). Las interacciones electrostáticas establecidas entre los grupos carboxilato de las cadenas laterales de los residuos de glutamato de este *locus* y el ion permeante determinan la afinidad del filtro de selectividad por el ion y varían según el catión involucrado. Cuanto mayor sea la afinidad del catión por el *locus EEEE*, más rápida será su entrada al poro del canal y más lenta su salida por el extremo intracelular del mismo. Al ser competitivas las interacciones entre los diferentes cationes con este *locus*, normalmente es el catión con más afinidad el que se une y desplaza a los demás iones del interior del canal (9). Por esta razón, en condiciones fisiológicas, dichos canales conducen fundamentalmente iones calcio, catión por el que tienen una gran afinidad, en vez de iones sodio o potasio, mucho más abundantes en el medio celular. Pese a ello, otros cationes que normalmente no se encuentran en el organismo, como los metales pesados cadmio y plomo, tienen mayor afinidad por el *locus EEEE*. Esta elevada afinidad hace que su tránsito por el poro sea más lento que el del calcio, con lo que actúan como bloqueadores del canal (9). El hecho de

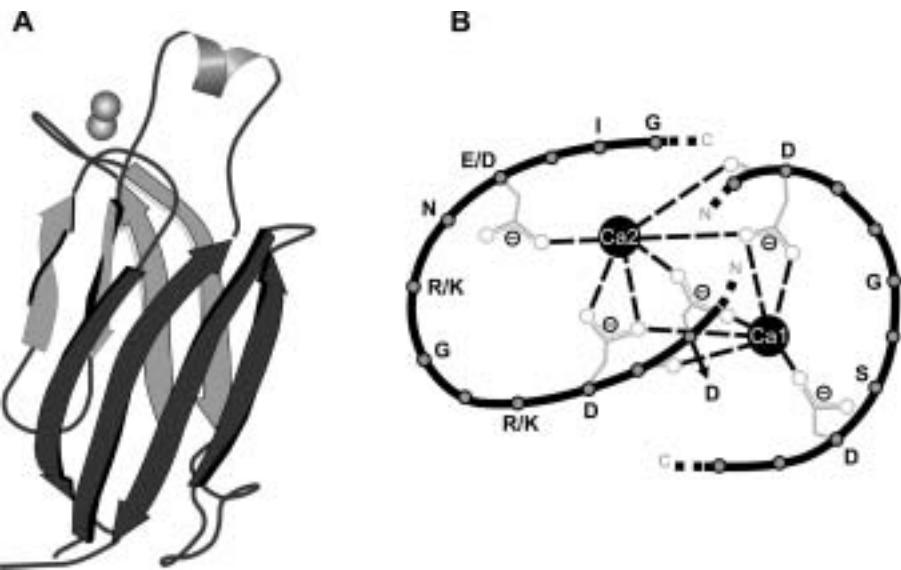


Fig. 2. Dominios tipo C2. **A)** Representación de un dominio tipo C2 en la fosfolipasa A2 citosólica. La coordinación del calcio se realiza por los lazos que conectan las hebras β (flechas gruesas) a uno de los lados del sándwich β (modificado de <http://spot.colorado.edu/~falke/figures/fig5/figure5.html>). **B)** Representación esquemática de los lazos que coordinan el calcio en el motivo C2B de la sinaptotagmina 1. Se destacan en gris los residuos ácidos que participan en la coordinación de dos iones de Ca^{2+} (Ca1 y Ca2). Las líneas gruesas representan las cadenas peptídicas. Las letras se refieren a los aminoácidos que conforman la cadena con la abreviatura de una sola letra. Además de su función coordinante, estos lazos participan en asociaciones con la membrana plasmática y con proteínas relacionadas con la exocitosis de neurotransmisor (modificado de 40).

que el bloqueo del canal por estos iones sea en sí una permeación más lenta del ion bloqueador establece que dichos canales sean una de las principales vías de entrada para los metales pesados hacia el espacio intracelular en células excitables (25).

Estudios comparativos con distintos canales de calcio han mostrado que el plomo es capaz de bloquear efectivamente canales tipo L, N, R y P (32, 43). Además de bloquear las corrientes de calcio, el plomo es capaz también de bloquear algunas corrientes de potasio (23).

Dada la ubicación de los canales iónicos en la superficie celular, es lógico suponer que se encuentran entre los primeros blancos de los iones plomo. En neuronas y células excitables la activación de los canales de calcio determina un aumento intracelular de este ion, señal que dispara diversos procesos entre los que destaca la liberación de neurotransmisores. En este nivel se concentran muchos de los efectos neurotóxicos del plomo (24).

Blancos intracelulares del plomo

Como ya se mencionó, la capacidad del plomo para reemplazar al calcio es un fenómeno presente en numerosas proteínas que poseen en su estructura motivos de unión para cationes divalentes, principalmente calcio, zinc y probablemente hierro y magnesio (22).

Al respecto se ha observado que representantes de las dos principales familias de motivos proteicos de unión a calcio, "mano-EF" y C2, presentan una alta afinidad por los iones plomo (6, 41, 47). Aunque siguen el mismo principio de coordinación para el calcio descrito con anterioridad, estas dos familias constituyen dos arreglos estructurales distintos para la unión a cationes. El motivo de unión a calcio "mano-EF" (denominado así porque su estructura semeja los dedos pulgar e índice de una mano) es probablemente el más extendido entre las proteínas de unión a calcio. Se constituye por un arreglo hélice-lazo-hélice, en el cual usualmente son los residuos localizados en el lazo los que conforman el sitio de unión para cationes (calcio o magnesio). En ausencia de calcio u otro catión que ocupe este sitio, el dominio mantiene una conformación "cerrada", con ambas hélices en proximidad. La asociación del calcio al motivo produce la "apertura" de esta conformación, y las hélices adoptan una disposición más perpendicular entre sí (figura 2). Lo anterior exhibe regiones hidrofóbicas en la proteína que constituyen sitios de unión para otras moléculas. Entre las proteínas que exhiben el motivo EF en su estructura se cuentan la calmodulina y la parvalbúmina (21). Los motivos C2 están conformados por dos hojas β de cuatro hebras ensambladas en β sándwich; los sitios de unión a calcio (de dos a tres) se ubican en los lazos que conectan las hebras β en uno de los extremos del

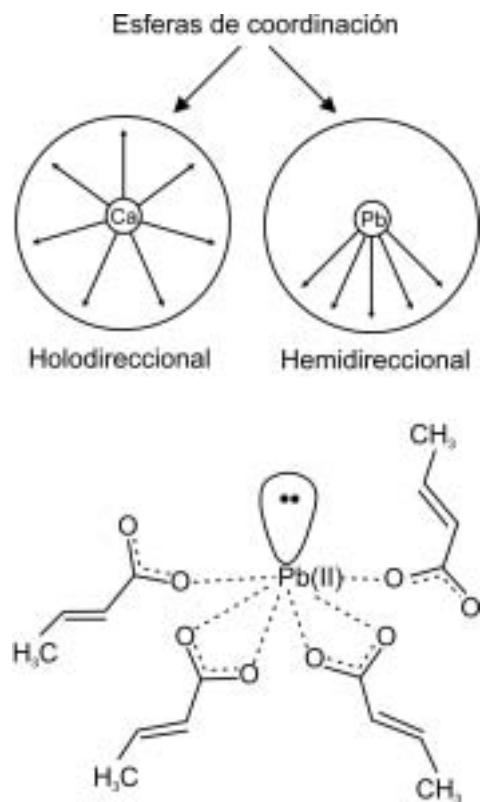


Fig. 3. Representación esquemática de la disposición de los grupos coordinantes para calcio y plomo. **A)** Los grupos de la esfera de coordinación del plomo tienden a adoptar una disposición hemidireccional por la presencia de un par inerte de electrones en el ion. En el calcio, la disposición suele ser más regular (holodireccional) (modificado de 39). **B)** Esquema de la disposición hemidireccional adoptada por los grupos que conforman la esfera de coordinación para el plomo en un compuesto con número de coordinación de seis.

sándwich (figura 3). Algunos de estos sitios exhiben esferas de coordinación incompletas para el ion, que son completadas con grupos ácidos pertenecientes a las moléculas con las cuales se asocia la proteína (lípidos y proteínas), lo que incrementa de manera importante su afinidad por el calcio. A diferencia de los motivos EF en que la principal modificación tras la unión al calcio es de tipo estructural, las modificaciones occasionadas en los motivos C2 son eminentemente eléctricas, siendo secundarios los cambios estructurales en la proteína. Esto ha llevado a que el motivo C2 se conciba como un *switch* electrostático para la asociación con otras moléculas cargadas. Esta familia de motivos participa generalmente en la asociación directa con membranas biológicas y con algunas proteínas que se encuentran en la proximidad de éstas. Las sinaptotagminas y la proteína cinasa C (PKC) son algunos ejemplos de proteínas que exhiben el motivo C2 (35). El plomo es un activador más potente que el calcio para la calmodulina (47), la PKC (41) y la

sinaptotagmina I (6), todas ellas proteínas involucradas de forma importante en la señalización intra e intercelular. A través de estas proteínas, el plomo también afecta el funcionamiento de proteínas sensibles a calcio, así como de proteínas que participan en el ciclo vesicular (cinasas dependientes de calmodulina-CamK's, calcineurina, SNARE's [*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*], etc.). La alteración que el mal funcionamiento de estas proteínas provoca en los sistemas de segundos mensajeros y procesos exocíticos contribuye en gran medida a la neurotoxicidad de este catión. En el caso concreto de la activación anormal de la calmodulina por el plomo (46), podemos observar un ejemplo de cómo se amplifican los efectos de este metal al afectar un elemento regulatorio común para varios sistemas. La calmodulina es una proteína con cuatro motivos EF repartidos en su estructura y constituye uno de los principales sensores de calcio para la célula al cambiar su conformación según el número de motivos EF ocupados por este ion (44). Numerosas cascadas de fosforilación y defosforilación, así como la generación/degradación de diversas moléculas señalizadoras como el cAMP o el óxido nítrico, dependen de la activación de la calmodulina y su interacción con proteínas a las cuales regula (11). La calmodulina participa en la modulación de diversos canales iónicos, entre los que se encuentran los canales de potasio activados por calcio tipo SK (*small-K*) e IK (*intermediate-K*), los canales de calcio tipo L, los receptores a NMDA, los receptores intracelulares a rianodina e inositol trifosfato y algunos canales activados por nucleótidos cíclicos (36). Un caso similar al de la calmodulina es el de la PKC, proteína activada por el plomo a concentraciones aún menores que las requeridas por la calmodulina (8) y que participa en diversos sistemas reguladores de la célula.

Organelas

Acorde con la presencia, función y ubicación de las distintas proteínas de unión a cationes, el plomo afecta en forma distinta las diferentes organelas celulares, algunas de las cuales tienden a acumularlo. El plomo se concentra y produce daños en la mitocondria, reduciendo el metabolismo energético celular y favoreciendo la generación de radicales libres (22). También inhibe la captura mitocondrial del calcio citoplásmico a la vez que favorece la liberación del calcio contenido en esta organela. Al promover la apertura del poro de transición mitocondrial, con la consiguiente liberación de citocromo C al citoplasma, induce la muerte celular por apoptosis (16). La síntesis del grupo hemo, otra tarea de la mitocondria, también resulta afectada (22).

El retículo endoplásmico es uno de los principales reservorios de calcio en el interior celular. El plomo inhibe el funcionamiento de ATPasas de calcio del retículo, lo que incrementa la concentración citoplásica del calcio con una consecuente reducción luminal del ion (17). Muchas de las proteínas de señalización y maduración conformacional en el retículo endoplásmico dependen del calcio para su funcionamiento, por lo que la depleción de este ion acarrea alteraciones en su actividad (34). Asimismo, el plomo se puede unir en forma directa a algunas chaperonas reticulares con efectos deletéreos para las proteínas. Es el caso de la chaperona molecular GRP78, requerida para la expresión funcional de diversas proteínas y relacionada con la regulación del proceso apoptótico (34). En células expuestas al plomo se ha observado la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, con la consecuente activación del sistema UPR (*unfolded protein response*) de respuesta a proteínas mal plegadas (34).

El núcleo es uno de los sitios que más plomo acumulan en el interior celular al unirse este metal con la cromatina y diversas proteínas nucleares (19). Desde hace varios años se ha observado que el plomo y otros metales pesados tienen efectos carcinogénicos en animales de laboratorio. Entre los trabajadores expuestos laboralmente a elevados niveles de plomo existe una mayor incidencia de neoplasias (2). Recientemente se han logrado identificar blancos nucleares del plomo relacionados con la regulación y estabilidad genética. Entre estos blancos destacan los denominados *Dedos de Zinc*, motivos protéicos encargados de mediar la unión al ADN de una infinidad de factores de transcripción y que, para ser funcionales, requieren coordinar en su interior un átomo de zinc que los estabilice estructuralmente en la conformación adecuada. Cuando el plomo sustituye al zinc en su esfera de coordinación, altera la conformación del dominio proteico, con lo que impide su unión al ADN y su funcionamiento como regulador genético (13,14).

Otro importante blanco nuclear del plomo son los sistemas de reparación del ADN. La nucleasa Ape1 forma parte del sistema de localización y escisión de daños en el genoma celular al eliminar residuos apurínicos/apirimidínicos del ADN, una alteración muy común. El plomo se une a la nucleasa Ape1 e inhibe su funcionamiento, lo que permite la acumulación de daños mutagénicos en el genoma (26). En este sentido, se ha observado que el plomo puede actuar como un cocarcinógeno al potenciar el efecto de agentes carcinogénicos sobre el ADN. Otros efectos del plomo son la hidrólisis del ARN (39), la inhibición de la pirimidina5'-nucleotidasa (encargada de degradar el ARN) (19), la interferencia con la señalización por

glucocorticoides (2) y la inhibición de enzimas antioxidantes y enzimas relacionadas con procesos biosintéticos de diversa índole (22).

Salud pública

La elevada afinidad del plomo por los motivos de unión a metales hacen que aun a bajas concentraciones usualmente consideradas como "seguras", pueda interferir con el funcionamiento celular (22).

En 1991 el gobierno de Estados Unidos estableció un nivel mínimo de plomo en sangre (parámetro comúnmente usado para evaluar la presencia del metal en el organismo) de 10 µg/dl como límite inferior de importancia médica (2), mismo que ha sido adoptado por diversas organizaciones de salud pública de todo el mundo (42). Pese a ello, estudios en niños han demostrado la presencia de alteraciones neurológicas irreversibles en concentraciones por debajo de este límite (< 9 µg/dl) (4, 22), con lo que se estable una correlación de tipo más lineal que umbral entre los niveles de plomo en sangre y las alteraciones neurológicas que se asocian a ellos (4) (figura 4), lo que apoya los hallazgos *in vitro* en los niveles celular y molecular.

La incapacidad del organismo para manejar y eliminar de sus tejidos el plomo en forma efectiva propicia que este metal se acumule en su interior. Mientras que la vida media del metal en sangre es de sólo 35 días, en el cerebro es de alrededor de dos años, y en hueso es de décadas (22). Estos depósitos a largo plazo sirven a su vez como reservorios del metal, lo que eleva los niveles sistémicos de plomo al ser movilizados tiempo después de la exposición inicial (2, 22).

Neurotoxicidad del plomo

El plomo es un neurotóxico cuyas consecuencias sobre la salud se conocen desde antes de nuestra era (42). Sus efectos más graves ocurren en el Sistema Nervioso en desarrollo, por lo que la intoxicación en niños suele causar estragos importantes en sus habilidades motoras y cognitivas (4, 22). La exposición infantil al plomo se correlaciona usualmente con decrementos irreversibles en el coeficiente intelectual, y se estima una reducción de 2 a 4 puntos de coeficiente intelectual por cada µg/dl de aumento del plomo en sangre dentro de los niveles entre 5-35 µg/dl (19). Así, se ha reportado lectura deficiente, discalculia, alteraciones en la memoria a corto plazo y en la construcción visual con niveles sanguíneos de plomo tan bajos como 2.5 µg/dl (19). Sin embargo, los efectos del plomo van más allá de las alteraciones cognitivas, y numerosos autores han señalado la inconveniencia de enfocarse únicamente en las pruebas de inteligencia para evaluar

Concentración de plomo en sangre ($\mu\text{g Pb/dl}$)

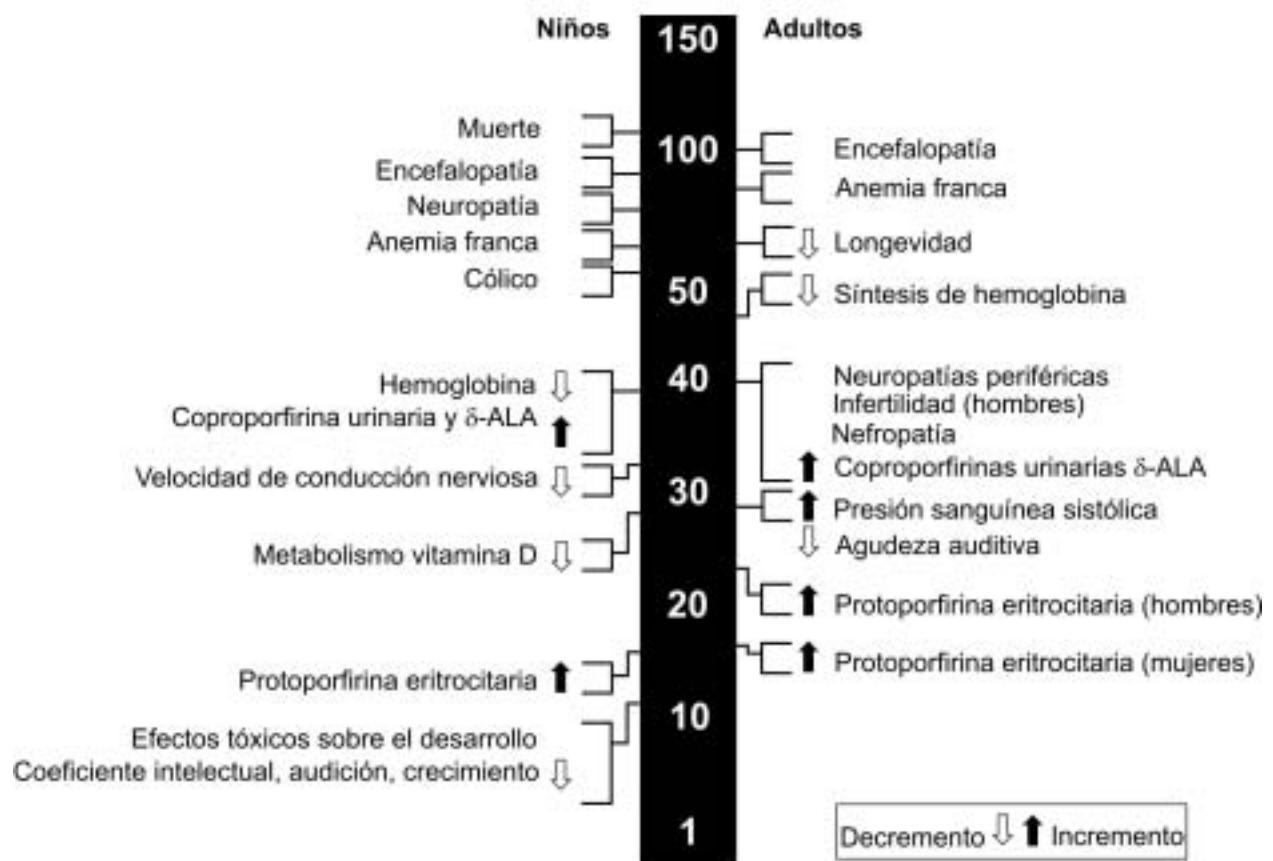


Fig. 4. Correlación entre distintos niveles de plomo en sangre en el humano (expresados en microgramos de plomo por decilitro de sangre) y distintas alteraciones patológicas observadas tanto en niños como en adultos. Nótese que en niños estas alteraciones suelen ser más graves y de aparición más temprana. En México, de acuerdo con el Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA), la exposición máxima aceptable establecida para plomo es de $1.5 \mu\text{g/m}^3$ hasta por tres meses (modificado de 19).

el daño en una intoxicación de bajo nivel (22). Un hallazgo francamente preocupante y que daría una nueva dimensión a la problemática social del plomo es la presencia de trastornos conductuales con predisposición a las conductas violentas en los infantes que sufrieron intoxicación por plomo. En estos individuos se ha observado un aumento en la agresividad e impulsividad, así como el desarrollo de déficits de atención (46). Diversos investigadores han señalado una correlación entre niveles de plomo y criminalidad (46), y en algunos casos la intoxicación por plomo es la variable de mayor valor predictivo para el desarrollo de conductas criminales en el individuo (4). Pese a ello, y para no caer en reduccionismos, aún se encuentra en debate esta relación plomo-criminalidad, y un importante cofactor común lo es la problemática social a la que está sujeto el individuo que presenta deficiencias cognitivas ocasionadas por el plomo (46).

Se ha propuesto también la participación del plomo en la generación de trastornos neuropsicológicos más

graves como la esquizofrenia, aunque nos parece que aún se carece de evidencia experimental concluyente que sustente esta relación (31). Entre los mecanismos por los que el plomo causa daños en el sistema nervioso, podemos mencionar la peroxidación de lípidos, la excitotoxicidad, las alteraciones en la síntesis, el almacenamiento y la liberación de neurotransmisores, en la expresión y el funcionamiento de receptores, las alteraciones en el metabolismo mitocondrial, la interferencia con los sistemas de segundos mensajeros, los daños a las células cerebrovasculares, la astrogliosis y la oligodendroglia, que causan defectos en la mielinización, la interferencia con los receptores NMDA y, en forma indirecta, la formación de ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA), lo que inhibe la neurotransmisión por GABA (22). Aunque el plomo permea todos los tejidos del organismo, algunos componentes del Sistema Nervioso Central exhiben un mayor daño tras la exposición, y el hipocampo es una de las áreas más afectadas (2).

Las neuronas expuestas al plomo pueden mostrar un aumento en su actividad eléctrica y una disminución en la misma, sin que hasta el momento se haya encontrado una explicación completa para este fenómeno. Empero, es probable que se relacione con la expresión de los diferentes blancos moleculares para el plomo en la célula.

Una historia inconclusa

Conscientes de los peligros que implica para la salud la presencia ambiental del plomo, numerosos países, incluido México, han puesto en marcha desde hace años políticas encaminadas a eliminar dicho metal de la mayoría de sus procesos industriales (42). Esto se ha logrado con muchos esfuerzos por parte de la sociedad y, en algunos casos, con el franco enfrentamiento entre la comunidad científica y el sector industrial, el cual ha buscado desacreditar por diversos medios (por fortuna sin éxito) los hallazgos sobre la toxicidad del plomo (46). Pese a que actualmente se han conseguido importantes avances, como la eliminación del plomo en pinturas y gasolinas, el problema aún dista de estar resuelto. El plomo, al igual que otros metales pesados, no es degradable, por lo que una vez que se libera al ambiente tiende a permanecer allí por largos períodos de tiempo. El plomo liberado a la biosfera a lo largo del siglo XX aún puede encontrarse en nuestro entorno, principalmente en los suelos cercanos a grandes avenidas, en los viejos edificios o en el fondo de mantos acuíferos contaminados, la mayoría aún en formas biodisponibles (27, 42). En el caso de México, donde las políticas de protección ambiental han sido aplicadas de manera tardía y, en algunos casos, deficiente, y donde las condiciones de pobreza y marginación aumentan la vulnerabilidad a la intoxicación por este metal, aún tendremos que lidiar por muchos años con las consecuencias de la incorporación del plomo a nuestra industria, pese a haber sabido de antemano el riesgo que implicaba para la salud.

Con todo, el plomo no representa un caso aislado. El avance tecnológico propicia que constantemente ingresen al ambiente agentes físicos y químicos de potencial patogénico incierto. La población se encuentra permanentemente expuesta a metales (48), agentes químicos (12) e incluso a campos electromagnéticos de diversas frecuencias e intensidades (37) sobre los cuales existen polémicas respecto de los efectos que pueden ejercer sobre la salud humana. Aunque existen pruebas a favor y en contra de su uso, en muchos casos no se han adoptado medidas precautorias por el costo económico que implican. El poco interés que en algunos casos se pone a las evidencias adversas a la

utilización de estos agentes plantea la posibilidad de que el caso del plomo, además de ser una historia todavía inconclusa, sea una historia que podríamos estar condenados a repetir en el futuro.

REFERENCIAS

1. ADONAYLO VN, OTEIZA PI: Pb²⁺ promotes lipid oxidation and alterations in membrane physical properties. *Toxicology*, 132(1):19-32, 1999.
2. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, 1999.
3. BALLATORI N: Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health Perspect*, 110(Supl 5):689-694, 2002.
4. BELLINGER DC: Lead. *Pediatrics*, 113(4 Supl):1016-1022, 2004.
5. BERG J, LIPPARD S: *Principles of Bioinorganic Chemistry*. University Science Books. California, 1994.
6. BOUTON CM, FRELIN LP, FORDE CE, ARNOLD GODWIN H, PEVSNER J: Synaptotagmin I is a molecular target for lead. *J Neurochem*, 76(6):1724-1735, 2001.
7. BRANDENC, TOOZE J: *Introduction to Protein Structure* (Segunda edición). Garland Publishing, Nueva York, 1999.
8. BRESSLER J, KIM KA, CHAKRABORTI T, GOLDSTEIN G: Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochem Res*, 24(4):595-600, 1999.
9. CLOUES RK, CIBULSKY SM, SATHER WA: Ion interactions in the high-affinity binding locus of a voltage-gated Ca²⁺ channel. *J Gen Physiol*, 116(4):569-586, 2000.
10. FUJIWARA Y: Cell biological study on abnormal proteoglycan synthesis in vascular cells exposed to heavy metals. *J Health Sci*, 50(3):197-204, 2004.
11. GHOSH A, GREENBERG ME: Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, 268(5208):239-247, 1995.
12. GIMENO S, GERRITSEN A, BOWMER T, KOMEN H: Feminization of male carp. *Nature*, 384(6606):221-222, 1996.
13. GODWIN HA: The biological chemistry of lead. *Curr Opin Chem Biol*, 5(2):223-227, 2001.
14. HANAS JS, RODGERS JS, BANTLE JA, CHENG YG: Lead inhibition of DNA-binding mechanism of Cys(2) His(2) zinc finger proteins. *Mol Pharmacol*, 56(5):982-988, 1999.
15. HASHEMZADEH-GARGARI H, GUILARTE TR: Divalent cations modulate N-methyl-D-aspartate receptor function at the glycine site. *J Pharmacol Exp Ther*, 290(3):1356-1362, 1999.
16. HE L, POBLENZ AT, MEDRANO CJ, FOX DA: Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*, 275(16):12175-12184, 2000.
17. HECHTENBERG S, BEYERMANN D: Inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase activity by cadmium, lead and mercury. *Enzyme*, 45(3):109-115, 1991.
18. KATZ AK, GLUSKER JP, BEEBE SA, BOCK CW: Calcium ion coordination: a comparison with that of beryllium, magnesium and zinc. *J Am Chem Soc*, 118:5752-5763, 1996.
19. KLAASSEN C: Heavy metals and heavy-metal antagonists. En: Hardman J, Limbird L, Gilman A (eds). *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (decimal edición). McGrawHill, pp. 1851-1875, Nueva York, 2001.
20. LEINDERS T, VAN KLEEF RG, VIJVERBERG HP: Divalent cations activate small- SK and large-conductance BK channels in mouse neuroblastoma cells: selective activation

- of SK channels by cadmium. *Pflugers Arch*, 422(3):217-222, 1992.
21. LEWIT-BENTLEY A, RETY S: EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 10(6):637-643, 2000.
 22. LIDSKY TI, SCHNEIDER JS: Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain*, 126(Pt1):5-19, 2003.
 23. MADEJA M, MUSSHOFF U, BINDING N, WITTING U, SPECKMANN EJ: Effects of Pb²⁺ on delayed-rectifier potassium channels in acutely isolated hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, 78(5):2649-2654, 1997.
 24. MANALIS RS, COOPER GP, POMEROY SL: Effects of lead on neuromuscular transmission in the frog. *Brain Res*, 294(1):95-109, 1984.
 25. MAZZOLINI M, TRAVERSO S, MARCHETTI C: Multiple pathways of Pb(2+) permeation in rat cerebellar granule neurones. *J Neurochem*, 79(2):407-416, 2001.
 26. MCNEILL DR, NARAYANA A, WONG HK, WILSON DM 3rd: Inhibition of Apel nuclease activity by lead, iron, and cadmium. *Environ Health Perspect*, 112(7):799-804, 2004.
 27. MIELKE HW: Lead in the Inner Cities. *American Scientist*, 87(1):62-73, 1999.
 28. MIKE A, PEREIRA EF, ALBUQUERQUE EX: Ca²⁺-sensitive inhibition by Pb²⁺ of alpha7-containing nicotinic acetylcholine receptors in hippocampal neurons. *Brain Res*, 873(1):112-123, 2000.
 29. NAGATA K, HUANG CS, SONG JH, NARAHASHI T: Lead modulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor in PC12 cells. *Brain Res*, 754(1-2):21-27, 1997.
 30. NELSON MR, CHAZIN WI: Calmodulin as a calcium sensor. En: Van Eldik L, Watterson D (eds). *Calmodulin and Signal Transduction*. Academic Press, 17-64, San Diego, 1998.
 31. OPLER MG, BROWN AS, GRAZIANO J, DESAI M, ZHENG W, SCHAEFER C, FACTOR-LITVAK P, SUSNER ES: Prenatal lead exposure, delta-aminolevulinic acid, and schizophrenia. *Environ Health Perspect*, 112(5):548-552, 2004.
 32. PENG S, HAJELA RK, ATCHISON WD: Characteristics of block by Pb²⁺ of function of human neuronal L-, N-, and R-type Ca²⁺ channels transiently expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol*, 62(6):1418-1430, 2002.
 33. PROZIALECK WC, GRUNWALD GB, DEY PM, REUHL KR, PARRISH AR: Cadherins and NCAM as potential targets in metal toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 182(3):255-265, 2002.
 34. QIAN Y, TIFFANY-CASTIGLIONI E: Lead-induced endoplasmic reticulum (ER) stress responses in the nervous system. *Neurochem Res*, 28(1):153-162, 2003.
 35. RIZO J, SUDHOFF TC: C2 domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem*, 273(26):15879-15882, 1998.
 36. SAIMI Y, KUNG C: Calmodulin as an ion channel subunit. *Ann Rev Physiol*, 64:289-311, 2002.
 37. SALFORD LG, BRUN AE, EBERHARDT JL, MALMGREN L, PERSSON BR: Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones. *Environ Health Perspect*, 111(7):881-883, 2003.
 38. SATHER WA, MCCLESKEY EW: Permeation and selectivity in calcium channels. *Annu Rev Physiol*, 65:133-159, 2003.
 39. SHIMONI-LIVNY L, GLUSKER JP, BOCK CW: Lone pair functionality in divalent lead compounds. *Inorg Chem*, 37:1853-1867, 1998.
 40. SUDHOFF TC: Synaptotagmins: why so many?. *J Biol Chem*, 277(10):7629-7632, 2002.
 41. TOMSIG JL, SUSZKIWI JB: Multisite interactions between Pb²⁺ and protein kinase C and its role in norepinephrine release from bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*, 64(6):2667-2673, 1995.
 42. TONG S, VON SCHIRNDING YE, PRAPAMONTOL T: Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bull World Health Organ*, 78(9):1068-1077, 2000.
 43. UJIHARA H, SASA M, BAN T: Selective blockade of P-type calcium channels by lead in cultured hippocampal neurons. *Jpn J Pharmacol*, 67(3):267-269, 1995.
 44. VETTER SW, LECLERC E: Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. *Eur J Biochem*, 270(3):404-414, 2003.
 45. VILLEDA-HERNANDEZ J, BARROSO-MOGUEL R, MENDEZ-ARMENTA M, NAVA-RUIZ C, HUERTA-ROMERO R, RIOS C: Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain Res Bull*, 55(2):247-251, 2001.
 46. WAKEFIELD J: The lead effect? *Environ Health Perspect*, 110(10):A574-A580, 2002.
 47. WILSON MA, BRUNGER AT: Domain flexibility in the 1.75 Å resolution structure of Pb²⁺-calmodulin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallog*, 59(Pt 10):1782-1792, 2003.
 48. YOKEL RA: Brain uptake, retention, and efflux of aluminum and manganese. *Environ Health Perspect*, 110 (Supl 5):699-704, 2002.