

Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen 52
Volume 52

Número 3
Number 3

Julio-Septiembre 2005
July-September 2005

Artículo:

Estudio *in vitro* de la disminución del plomo en eritrocitos en presencia de glucosa

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



medigraphic.com

Estudio *in vitro* de la disminución del plomo en eritrocitos en presencia de glucosa

Palabras clave: Plomo, saturnismo, quelación, penicilamina, cisteína, EDTA, glucosa.

Key words: Lead, saturnism, quelation, penicillamine, EDTA, cistein, glucose.

Recibido: 17/11/04
Aceptado: 10/03/05

Guillermo Zecua Hernández,* Ángeles Ochoa Rico,** Emilia Ibarra V***

* Jefe de Laboratorio de la UMF 52.

Profesor de Bioquímica de la ENCB del IPN.

** Química del IMSS.

*** Jefa de Enseñanza e Investigación Médica, UMF 52

Correspondencia:
Guillermo Zecua Hernández.
Dept. de Bioquímica
Escuela Nacional de Ciencias
Biológicas, IPN. México, D.F.

Resumen

El plomo en la naturaleza es muy abundante ya que proviene de diversas fuentes naturales y antropogénicas. La mayoría de la población inhala diariamente en zonas urbanas aproximadamente 40 mg de plomo; de esta cantidad sólo 15 mg se distribuyen en el organismo y se depositan en tejidos blandos, huesos; otra parte atraviesa la barrera placentaria y hematoencefálica para causar la enfermedad llamada saturnismo. El plomo tiene la capacidad de inhibir la actividad de algunas enzimas como es el caso de la delta aminolevulinicosintetasa, que bloquea la formación del grupo HEM. Los quelantes más utilizados son penicilamina, EDTA y dimercaprol. Se realizó un ensayo experimental utilizando eritrocitos humanos *in vitro* para determinar si la glucosa tiene alguna interacción en la fijación de plomo en los eritrocitos. Para analizar este efecto se utilizó nitrato de plomo expuesto a tiempos de incubación de uno a 120 minutos a 37° C y se probaron las siguientes sustancias: penicilamina, EDTA, cisteína y glucosa. Las determinaciones de plomo se realizaron con la técnica de la ditzona. Todas las sustancias en reto mostraron cierto grado de quelación del plomo. La glucosa también presentó esta capacidad de quelación por medio de un mecanismo indirecto derivado del metabolismo de la glucosa. El glutatión reducido en los eritrocitos puede capturar al plomo debido a la presencia de un grupo sulfhidrilo, de la misma forma que lo realiza la cisterna.

Abstract

171

Lead is one of the most abundant elements in nature because it comes from many natural and anthropogenic sources. Most of the population of urban areas breathes an average of 40 mg of lead everyday. From that average, just 15 mg are distributed in the body among the soft tissues, bones, etc. These lead may pass through the placenta or the hematoencefalic barrier causing a disease called saturnism. Lead may inhibit or diminish the functionality of certain enzymes such as delta aminolevulic sintetase (that inhibits the production of HEM groups. For this investigation it was run an experiment using human erythrocytes *in vitro* in order to see if the level of glucose in the body has any relationship with the absorbance of lead by the erythrocytes. For this experiment the erythrocytes were exposed to lead nitrate for 120 minutes. Several substances were added to the above mixture to analyze the final level of lead absorbance; the substances used were penicillamine, EDTA, cistein and glucose. The first three did diminish the lead's absorbance; glucose also had a similar effect but in a less percentage. This effect of glucose is due to an indirect process rather than a direct one. The metabolism of glucose in the erythrocytes is made through the cycle of mono-phosphate pentose and the presence of reduced glucose captures some lead because of the presence of sulfhydryl groups (same case as cystein). All lead's measures were made using ditozone with carbon tetrachloride.

Introducción

El funcionamiento de la vía pentosas fosfato en los eritrocitos es importante para el mantenimiento de su viabilidad. El eritrocito maduro es incapaz de sintetizar proteínas y carece de mitocondrias. Necesita energía para la síntesis de compuestos simples, como glutatión, coenzimas y ATP, y esta energía se obtiene a partir del metabolismo de la glucosa. La obtención de ATP se consigue mediante glucólisis anaerobia con formación de ácido láctico. La formación de NADPH por la vía pentosas fosfato aporta electrones para la reducción de la metahemoglobina (la forma Fe^{3+} de la hemoglobina) que no pueda unirse al oxígeno pero que se está formando constantemente, así como para el mantenimiento de glutatión en su forma reducida.¹⁻⁴

El hombre ha utilizado el plomo desde hace muchos años; los egipcios ya lo utilizaban para videriar vasijas alrededor de los años 7000 y 5000 a.C. El primer artefacto de plomo que se conoce fue encontrado en los Dardanelos donde se asentaba una civilización llamada Abidos y data de antes del año 3800 a.C.; los romanos utilizaron plomo para sus tuberías, lo mismo que en innumerables objetos. Su aumento ha sido notorio, sobre todo a partir de 1750, y es paralelo al desarrollo de la Revolución Industrial. El plomo es un elemento abundante que proviene de fuentes naturales y antropogénicas; se encuentra distribuido en aire, agua, suelos, plantas y animales. Los humanos lo absorben desde la vida intrauterina hasta su muerte, la enfermedad por plomo se le conoce como saturnismo. El plomo ingresa por vía respiratoria, digestiva y cutánea.

El plomo forma enlaces covalentes con los grupos sulfhidrilos. Muchas proteínas en el organismo, incluyendo gran número de enzimas, contienen residuos de cisterna que poseen grupos sulfhidrilos libres. Las proteínas son casi siempre inactivadas como es el caso de la inhibición que hace el plomo sobre la síntesis del grupo hemo de

la hemoglobina, se une a la enzima delta-aminolevulínato sintetasa.⁵⁻⁹

Los agentes quelantes tienen la propiedad de formar complejos muy estables con iones de plomo. Los más utilizados son: Dimercaprol, D-penicilamina y etilendiaminotetraacético (EDTA).^{6-8,10-17}

El presente estudio propone la utilización de glucosa como bloqueador de la fijación de plomo en los eritrocitos.

Material y métodos

Fueron analizadas 100 muestras de un depósito de sangre total con heparina, obtenida de 50 personas clínicamente sanas a quienes se habían practicado estudios de laboratorio de glucosa, colesterol, triglicéridos y hemoglobina y cuyos resultados estuvieron dentro de límites de referencia aceptables. Todas las personas participantes fueron elegidas al azar; son derechohabientes del IMSS adscritos en la Unidad de Medicina Familiar no. 52, ubicado en Cuautitlán Izcalli en el Estado de México. Ésta es una zona de poca contaminación ambiental.

Criterios de inclusión. Personas de uno u otro sexo, clínicamente sanas, con edad comprendida entre 20 y 50 años.

Criterios de no inclusión. Sujetos diabéticos, hiperlipémicos o anémicos y personas que tuvieran antecedentes de estar en contacto con plomo.

Para la toma de muestras se requería que los sujetos tuvieran por lo menos ocho horas de ayuno. En cada caso se obtuvieron 4 mL de sangre; las muestras fueron anticoaguladas con 0.2 mg/mL de heparina y centrifugadas a 2,500 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos. La cuantificación de plomo se realizó con el método de la difeniltiocarbazona (ditizona)^{8,17,18,20} disuelta en tetracloruro de carbono. Se utilizó un espectrofotómetro marca Stasar II para realizar las lecturas a 510 nm. La ionización del plomo se llevó a cabo con un equipo de digestión marca Thermolyne. Todo el material de

vidrio se lavó con una mezcla de ácido nítrico y agua desionizada 1:1 para garantizar la eliminación de cualquier residuo de plomo.

Fueron integrados cuatro grupos de estudio más uno que sirvió como testigo. En el grupo 1 se agregaron 2.0 mL de eritrocitos, 2.0 mL de nitrato de plomo (50 $\mu\text{g}/\text{dL}$) y 2.0 mL de penicilamina (sol. de 4 mg/dL). En el grupo 2: 2.0 mL de eritrocitos, 2.0 mL de nitrato de plomo (50 $\mu\text{g}/\text{dL}$) y 2.0 mL de cisteína (4 mg/dL). En el grupo 3: 2.0 mL de eritrocitos, 2.0 mL de nitrato de plomo (50 $\mu\text{g}/\text{dL}$) y 2.0 mL EDTA (4.0 mg/dL). En el grupo 4: 2.0 mL de eritrocitos, 2.0 mL de nitrato de plomo (50 $\mu\text{g}/\text{dL}$) y 2.0 mL de glucosa (5 g/dL). Finalmente, se conformó un grupo testigo con 2.0 mL de eritrocitos.

Las muestras fueron incubadas en baño maría y en agitación a 37° C. Las lecturas se llevaron a cabo en los minutos 1, 30, 60, 90 y 120. Al final de cada tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 2,500 rpm y al paquete globular se le realizó la técnica de la ditizona para calcular la concentración de plomo.¹⁸⁻²¹

Técnica empleada. Se trabajó con 2.0 mL de sangre total, la cual fue lavada con solución salina fisiológica y se desechó el sobrenadante; después se trabajó con el paquete globular. Para la digestión de la muestra, se utilizaron 1.5 mL de ácido perclórico al 70%, 5.0 mL de ácido nítrico concentrado y 5.0 mL ácido sulfúrico. La muestra se reflujo de dos a tres horas a 200° C y se dejó enfriar. Se adicionaron 2.5 mL de agua desionizada, 3.0 mL de hidróxido de amonio concentrado y 1.0 mL de hidroxilamina al 20% más 5.0 mL de la solución amortiguadora que tiene 118 g de citrato de amonio, 75 mL de hidróxido de amonio, 5 g de cianuro de potasio y 2.5 g de sulfato de sodio. Se ajustó el pH a 11 y se agregaron 5.0 mL de ditizona (30 mg en 100 mL de tetracloruro de carbono); se separó y se leyó a 510 nm. Como control de referencia se utilizó el nitrato de plomo a una concentración de 1 mg/dL.^{8,18-21}

Análisis estadístico. Los resultados de cada grupo fueron analizados con la prueba de t de Student.

Resultados

Fueron analizadas 100 muestras de un depósito de sangre total con heparina, obtenidas de 50 personas clínicamente sanas.

Las muestras de sangre fueron distribuidas en cuatro grupos. En cada grupo se realizaron 20 determinaciones de plomo; de igual forma, a cada grupo se le corrió un testigo, obteniendo un valor medio de 11.3 $\mu\text{g}/\text{dL}$ de plomo.

El grupo 1 fue tomado como referencia ya que a las muestras que lo integraron se les agregó penicilamina, sustancia utilizada para el tratamiento de personas con saturnismo. La figura 1 muestra las concentraciones de plomo obtenidas en los tiempos analizados. Se observa que en el minuto 1 se obtuvo una concentración de 18 $\mu\text{g}/\text{dL}$ de plomo; mientras que en el minuto 120 se detectó un valor de 5 $\mu\text{g}/\text{dL}$; estos resultados muestran una efectividad de quelación de 79.24% (desviación estándar de 2.23).

A las muestras del grupo 2 se les colocó cisteína, un aminoácido que, por contener un grupo sulfhidrilo, tiene capacidad para fijar al plomo. En el tiempo 1 se registró un valor de 27 $\mu\text{g}/\text{dL}$ de plomo y en el minuto 120, 5 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (figura 1). La efectividad de quelación fue de 73.50% con desviación estándar de 4.07, error estándar de 1.0 y valor de $p < 0.05$.

En el grupo 3 se agregó EDTA, una sustancia quelante también de uso común. El valor detectado en el minuto 1 fue 7 $\mu\text{g}/\text{dL}$ de plomo (cifra por debajo de la del testigo) y al minuto 120, 4 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (figura 1). La efectividad de quelación fue de 86.5% (superior a la de la penicilamina) con desviación estándar de 1.22, error estándar de 0.54 y valor de $p < 0.05$.

A las muestras del grupo 4 se les agregó glucosa como sustancia en reto para determinar si posee efectos quelantes. La figura 1 muestra los valores obtenidos en los tiempos analizados. Se observa que en el minuto 1 presentó 38 $\mu\text{g}/\text{dL}$ de plomo (cifra superior a la del testigo) y al minuto 120, 18

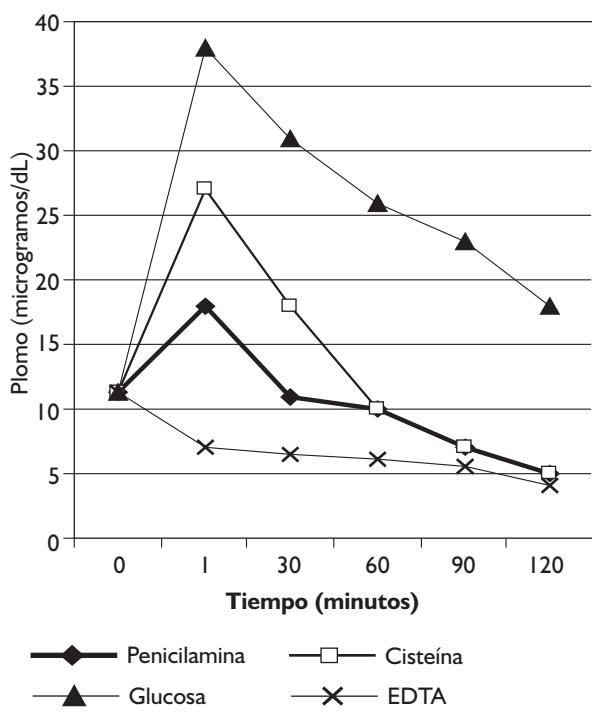


Figura 1. Disminución de plomo en los eritrocitos en presencia de agentes quelantes del plomo (penicilamina, cisteína, EDTA) y glucosa.

174

$\mu\text{g}/\text{dL}$. En este caso, la efectividad de quelación se estimó en 50.0% con desviación estándar de 4.71, error estándar de 1.13 y valor de $p < 0.05$.^{22,23}

Discusión

Este trabajo permite comprobar la actividad quelante de la penicilamina y del etilendiaminotetraacético (EDTA), las cuales mostraron, respectivamente, 79.24 y 86.50% de quelación.

La cisteína es un aminoácido que no se utiliza como agente quelante; sin embargo, presenta un grupo sulfhidrilo capaz de unirse al plomo. La capacidad de quelación registrada en este estudio fue de 73.5%.

La glucosa presentó 50.5% de quelación del plomo. Es una molécula cuya estructura química no permite enlace con el plomo; sin embargo, se observa actividad quelante, la cual puede ser atribuida al metabolismo del eritrocito.

La utilización del ciclo de las pentosas fosfato transforma a la glucosa en glucosa 6-fosfogluconato con la oxidorreducción del NADP^+ por presencia de glutatión oxidado (G-S-S-G) a glutatión reducido (2 G-SH). Este grupo sulfhidrilo del glutatión se puede unir al plomo. Sobre esta base, este ensayo experimental muestra que es posible utilizar a la glucosa como tratamiento de primera elección en pacientes con intoxicación por plomo y posteriormente administrar los quelantes antes mencionados.^{1-3,6,11,15}

Referencias

1. Christopher K, Mathews KE, Van Holde. *Biochemistry*. 2nd ed. New York, NY: Mc Graw-Hill Interamericana, 1998: 570.
2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley Sons, 1992: 623-625.
3. Lachant N, Tomada A, Tanaka KR. Inhibition of the pentose phosphate shunt by lead: A potential mechanism for hemolytic in lead poisoning blood. 1984; 518-526.
4. Bohinski R. *Modern concepts in biochemistry*. 5th ed. Newton, Massachusetts: Allyn and Bacon, 1991; 94-96.
5. Chalevelakis G, Bouronikou H, Yalouris AG et al. Delta aminolevulinic acid dehydratase as an index of lead toxicity time for a reappraisal. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 53.
6. Goodman GA, Goodman LS, Gilman A. *Bases farmacológicas de la terapéutica*. 6a ed. México: Panamericana 1982: 1573-1590.
7. Herberg S, Nikkanen J. Enzyme inhibition by lead under normal urban conditions. *Lancet* 1970; 1: 63.
8. Sanford T, Davidson I et al. *Clinical diagnosis by laboratory methods*. 15th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1984: 680-693.
9. Williams EB, Coller B, Kipps TJ. Sixth edition Hematology Medical Publishing Division. New York, NY: McGraw-Hill, 2001; 319-323.
10. Emmerson BT. Chronic lead neuropathy: The diagnostic use of calcium EDTA and the association with gout. *Aust Ann Med* 1963; 12: 310-324.
11. Friedheim E, Corvi C, Walker CJ. Mesodimercaptosuccinic acid: A chelating agent for the treatment of mercury and lead poisoning. *J Pharm Pharmacol* 1976; 28: 711-712.
12. Golberg AJA, Smith A. Lochead treatment of poisoning with oral penicillamine brit *ML* 1963; 1270-1275.
13. Markowitz ME, Rosen JF. Validation of an 8 hour EDTA provocative test. *J Pediatric* 1984; 104: 337.
14. Montgomery RL, Dry TW. Conway biochemistry a case oriented approach. 2nd ed. St Louis: CV Mosby, 1982; 159-161.
15. Friberg L, Nordberg GF, Vonk VB. *Handbook on the toxicology of metals*. Amsterdam: Elsevier North Holland, 1979: 451-484.
16. Kenneth WC, Warner F. *Air pollution, its origin and control*. 2nd ed. USA: Limusa, 1992: 414-417.
17. Molina B. Contaminación ambiental por plomo en áreas industriales. *Gac Med Mex* 1977; 113-213.
18. Cholak J, Hubbard D, Burkey R. Microdetermination of lead in biological material with dithizone at high ph. *An Chem* 1958; 20: 671-672.

19. Kaplan LA, Pesce AJ. *Química clínica. Técnicas de laboratorio*. 5a ed. México: Panamericana, 1990: 1616-1623.
20. Rice EW, Fletcher DC, Stumpff A. Lead in blood and urine. In: Meites S (ed). *Standard methods of clinical chemistry*. New York: Academic Press, 1975.
21. Standard test method for lead in the atmosphere by colorimetric dithizone procedure. In: *Annual book of ASTM standards*, part 26 method 3112-77. Philadelphia: American Society of Testing and Materials, 628-637.
22. Norville M, Downie RW. *Health basic statistical methods*. 5th ed. 1983; 47-74, 216-250.
23. Barnett RN. *Clinical laboratory statistics*. 2nd ed. Boston: Little Brown, 1983; 25-30.