

ESTUDIO DE LA TOXICIDAD POR PLOMO Y LA FUNCIÓN DE ALGUNAS PROTEÍNAS

Ruíz Ramírez Dulce Carolina (1), Alcaraz Contreras Yolanda (2), Martínez Alfaro Minerva (3).

1 [Químico farmacéutico biólogo, Universidad de Guanajuato] | [dcarolina_291093@hotmail.com]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [yolaalca@ugto.mx]

3 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [alfarom@ugto.mx]

Resumen

La contaminación por plomo es un problema global y actual. El plomo genera radicales libres lo que lleva al estrés oxidativo, el cual afecta a las células del organismo y al ADN. Para disminuir la formación de radicales libres la melatonina y la silimarina actúan como especies antioxidantes, disminuyendo los efectos adversos de los metales pesados. La función de la proteína transportadora de metales divalentes (DMT1) es el transporte de hierro, zinc y cobre desde el espacio extracelular al intracelular. En el presente trabajo se evaluó el efecto de melatonina y silimarina en ratas expuestas a plomo. Se realizó la técnica de Western blot para determinar la cantidad de proteína en hígado, riñón y testículo. DMT1 se encuentra en mayor cantidad en hígado y sus niveles disminuyen ante una intoxicación por plomo, protegiendo a los hepatocitos, y aumenta en las células renales como un posible mecanismo de eliminación del metal.

Abstract

Lead contamination is a global and current problem. The lead generates radical free which leads to oxidative stress, which affects the body's cells and DNA. To decrease free radicals melatonin and Silymarin act as antioxidants, reducing the adverse effects of heavy metals. The function of the conveyor protein of Divalent metal (DMT1) is the transport of iron, zinc and copper from the extracellular space to the intracellular. This study evaluated the effect of melatonin and silymarin in rats exposed to lead. Technique of Western blot to determine the amount of protein in liver, kidney and testis. DMT1 is more abundant in liver and its levels decrease to poisoning by lead, hepatocytes, protecting and increases in renal cells as a possible mechanism of metal removal.

Palabras Clave

Plomo; Melatonina; Silimarina; Antioxidante; Estrés oxidativo

INTRODUCCIÓN

Contaminación del plomo

La contaminación por plomo es un problema global que vemos en la industria minera, en la producción de cemento, de baterías y pinturas [1], a pesar de la implementación de regulaciones sobre el uso de este metal, la exposición y el peligro entre la población que vive muy cerca de las zonas industriales sigue siendo muy alto.

El envenenamiento por plomo se conoce como un trastorno importante que afecta a los individuos a través de la exposición aguda, subaguda y crónica en ambientes ambientales y ocupacionales [2].

- *Consecuencias de la exposición al plomo*

El plomo causa daño por la formación de radicales libres, generando especies reactivas de oxígeno (ROS), que dañan al ADN y reduce los niveles de óxido nítrico [3], provocando estrés oxidativo.

Los efectos negativos a la salud son especialmente graves en niños, en quienes suele provocar retraso mental y deficiencia en el crecimiento. En adultos, por la continua exposición, el metal induce activación pro-coagulante en los eritrocitos [4], efectos neurotoxicológicos [5] y nefrotoxicidad [6], debido a la alta concentración y al tiempo de permanencia relativamente largo del plomo en las células epiteliales tubulares renales [3].

DMT1 en la exposición al plomo

La proteína transportadora de metales divalentes (DMT1) es una proteína integral y contiene 12 dominios transmembranales. Se expresa altamente en las membranas de la corteza luminal del riñón, en el túbulo proximal y en el hígado [7].

DMT1 capta a metales esenciales como el hierro, cobre, manganeso y el zinc. Cuando ocurre una intoxicación esto se ve alterado, ya que el plomo se une a estos sitios de unión de la proteína, compitiendo con los cationes endógenos, causando una alteración en la estructura conformacional y la actividad biológica de las proteínas [8].

Melatonina y silimarina como tratamientos estudiados

El estrés oxidativo es un mecanismo común que contribuye a la iniciación y la progresión del daño en diversos órganos [9].

Para eliminar los radicales libres e incrementar la producción de especies antioxidantes se han estudiado la melatonina [10] y la silimarina [9].

La melatonina es una hormona producida por la glándula pineal, que cronomodula los sistemas biológicos, es antioxidante [11] y posee propiedades antiinflamatorias [12].

Estudios demuestran que la administración de la melatonina en conjunto el plomo reduce la toxicidad renal y hepática [13].

La silimarina es un flavonoide que se extrae de la planta *Silybum marianum*. La planta se ha utilizado desde el siglo IV a. C para trastornos del hígado, el bazo y la vesícula biliar [14].

La silimarina puede disminuir el estrés oxidativo y preservar la función mitocondrial en el riñón, potencialmente a través de la prevención de la acumulación de lípidos renales y beta-oxidación de ácidos grasos [15].

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del plomo, la melatonina y la silimarina sobre la proteína transportadora de metales divalentes en testículo, hígado y riñón de ratas machos Wistar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental.

Se utilizaron ratas machos de 5 semanas de edad mantenidas en condiciones de alimentación ad libitum y en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno. Posteriormente se dividieron en 9 grupos: (C) control, (1Pb) 50 mg Pb/Kg/2 meses, (1M) 10 mg de melatonina/Kg/1 mes, (1M+1S) 10 mg de melatonina/Kg/1 mes con 200 mg de silimarina/Kg/1 mes, (1S) 200 mg de silimarina/Kg/1 mes, (2Pb) 50 mg Pb/Kg/2 meses con 1 mes de descanso, (2M) 10 mg de melatonina/Kg/2 meses, (2M+2S) 10 mg de melatonina/Kg/2 meses con 200 mg de silimarina/Kg/2 meses, (2S) 200 mg de

silimarina/Kg/2 meses. El plomo y la silimarina se administraron por vía oral, la melatonina fue administrada vía intraperitoneal.

Al finalizar los tratamientos los animales se sacrificaron y se extrajeron el hígado, riñón y testículos. Inmediatamente se colocaron en nitrógeno líquido y se molieron. Se les agregó buffer de homogenización con inhibidores de proteasas.

Western blot

• Cuantificación de proteínas

La concentración total de proteínas solubles fue determinada mediante el método de Bradford [16], mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

• Electroforesis

La separación de los componentes proteicos del homogenado se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, en condiciones desnaturizantes y reductoras en el equipo Bio-Rad (Mini Protean III Cell) a un diferencial de potencial constante de 80 V por 30 minutos y posteriormente 100 V por 1:30 horas. Las muestras fueron preparadas agregando el volumen de homogenado necesario que contuviera 11 µg de proteína y un volumen igual de buffer de carga.

• Transferencia

La transferencia a la membrana de nitrocelulosa se llevó a cabo con un sistema semiseco. El tiempo y voltaje utilizados fue de 1:45 horas a 3 V. Las membranas fueron bloqueadas en una solución de leche descremada en polvo, al 5% (w/v) durante 2 horas. Posteriormente se realizaron lavados con buffer PBS 1X Tween-20 a temperatura ambiente y agitación constante durante diez minutos.

• Incubación con los anticuerpos.

Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con el anticuerpo primario (dil 1:1000) toda la noche a 4 °C y agitación constante. Como control endógeno se usó anticuerpo anti-GADPH. Posterior a la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron lavados exhaustivos y se incubó con el anticuerpo secundario chivo anti conejo acoplado a peroxidasa (dil 1:2000).

• Detección

Se utilizó el sistema Prime Western Blotting Detection Reagent Kit de la marca Amersham.

• Cuantificación

Para obtener el valor de densitometría se digitalizó la imagen y se analizó con el software Image Lab TM Versión 4.0 de Bio-Rad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los grupos expuestos a plomo se observó una disminución significativa de los niveles hepáticos de DMT1 con respecto al grupo control (Figura 1). Esto indica que, en el tejido hepático, DMT1 deja de ser utilizada para importar metal dentro de la célula, este proceso puede ser un mecanismo de defensa ante la intoxicación por plomo [17]. Los tratamientos con duración de un mes y dos meses con melatonina y silimarina administrados de forma individual y combinada provocaron un incremento en la cantidad de DMT1 en comparación con los grupos 1Pb y 2Pb. No se observó un cambio significativo entre el grupo de melatonina y silimarina, ambos antioxidantes parecieran actuar de la misma forma.

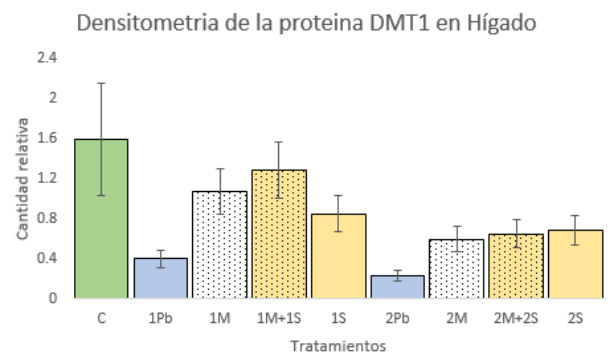


Figura 1: Cantidad relativa de proteína transportadora de metales divalentes (DMT1) en hígado.

En el caso del riñón, no se observa un cambio significativo entre el tratamiento a un mes con el de dos meses a excepción del grupo 1M+1S contra 2M+2S (Figura 2). Después de un mes de tratamiento los niveles de proteína incrementaron significativamente, y a los dos meses disminuyeron, lo que indica que la proteína trata de desechar el Pb hacia las células renales para su posterior eliminación.

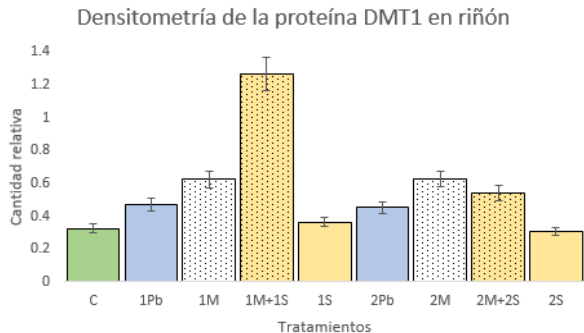


Figura 2: Cantidad relativa de proteína transportadora de metales divalentes (DMT1) en riñón.

En el testículo la cantidad de DMT1 mostró un incremento significativo en los grupos 1Pb y 1M+1S. En el grupo 2M la cantidad de DMT1 disminuyó respecto al grupo control. Figura 3. Al parecer, con el tratamiento de dos meses disminuye la cantidad de proteína.

Comparando los tres tejidos analizados, en hígado se encuentra en mayor cantidad la proteína transportadora de metales divalentes, siguiendo en riñón y en poca cantidad se encuentra en testículo.

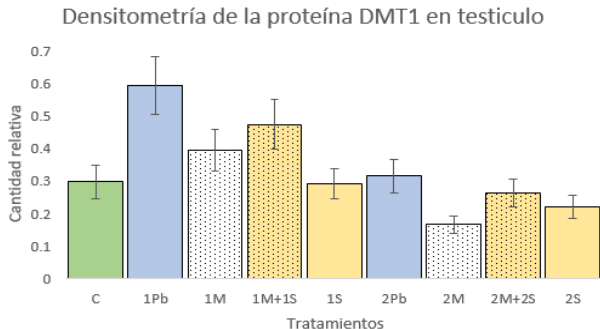


Figura 3: Cantidad relativa de proteína transportadora de metales divalentes (DMT1) en testículo.

CONCLUSIONES

Los niveles hepáticos de DMT1 disminuyen con la exposición a Pb. La melatonina y silimarina aumentan los niveles hepáticos de DMT1 actuando como antioxidantes y disminuyendo el estrés oxidativo causado por la intoxicación por Pb. En riñón el tratamiento combinado aumenta significativamente los niveles de DMT1 para aumentar la eliminación del metal. La exposición a

Pb aumenta el nivel de DMT1 y su valor disminuye al incrementar la duración de los tratamientos con melatonina y silimarina.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Yolanda Alcaraz Contreras, la Doctora Minerva Martínez Alfaro y la Doctora Karla Jazmín Soto Arredondo por su apoyo en la elaboración del proyecto.

REFERENCIAS

- [1] Ruiz R. D., Antaño M. A., Alcaraz C. Y., Amador L. G., Robles G. J., Martínez A. M. (2016) El plomo y sus efectos en la salud. *Ciencia y Desarrollo*, 286(42), 20-25.
- [2] El-Khishin I. A., Medhat E. Y., Abdel H. O. (2015). Role of garlic extract and silymarin compared to dimercaptosuccinic acid (DMSA) in treatment of lead induced nephropathy in adult male albino rats. *Toxicology Reports*, 2, 824-832.
- [3] Dotan Y., Lichtenberg D., & Pinchuk I. (2004). Lipid peroxidatio. Cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res*, 43(3), 200-27.
- [4] Shin J. H., Lim K. M., Noh J. Y., Bae O. N., Chung S. M., Lee M. Y., & Chung J. H. (2007). Lead-induce procoagulant activation of erythrocytes through phosphatidylserine exposure may lead to thrombotic diseases. *Chem. Res. Toxicology*, 20(1), 38-43.
- [5] White L. D., Coru-Slechta D. A., Gilbert M. E., Tiffany-Castiglioni E., Zawia N. H., Virgolimi M., Rossi-George A., Lasley S. M., Qian Y. C., & Basha M. R. (2007). New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 225(1), 1-27.
- [6] Weaver V. M., Jaar B. G., Schwartz B. S., Tood A. C., Ah K. D., Lee S. S., Wen J., Parsons P. J., & Lee B. K. (2005). Associations among lead dose biomarkers, urine acid, and renal funtion in Koream lead workers, *Eviron. Health Perspect*, 113(1), 36-42.
- [7] Abouhamed M., Gburek J., Liu W., Torchalski B., Wilhelm A., Wolff N. A., Christensen E. I., Thevenod F., Smith C. P. (2006). Divalent metal transporter 1 in the kidney proximal tubule is expressed in late endosomes/lysosomal membranes: implications for renal handling of protein-metal complexes. *Physiol Renal Physiol*, 290, 1525-1533.
- [8] Godwin H. A. (2001). The biological chemistry of lead. *Curr. Opin. Chem. Biol*, 5(2), 223-7.
- [9] Pradeep K., Raj M. C., Gobianand K., Karthikeyan S. (2006). Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. *European Journal of Pharmacology*, 560(2), 110-116.

- [10] Anwar, Md Jamir, Muhammad, Bala Yauri, Bader, Ahmed Abdulsabour, Abdulghani, Mahfoudh, Mahmood, Danish, & Haider, Mohammed. (2015). An insight into the scientific background and future perspectives for the potential uses of melatonin. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3), 139-152. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbas.2015.05.003>
- [11] Bonnefont-Rousselot D., & Collin F., (2010). Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 278(1), 55-67.
- [12] Carpentieri A., Diaz de Barboza G., Areco V., Peralta Lopez M., & Tolosa de Talamoni N. (2013). New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res*, 65(4), 437-44.
- [13] G. H. El-Sokkary., G. H. Abdel-Rahman., & E. S. Kamel, Melatonin protectd against lead-induced hepatic and renal toxicity in male rats. *Toxicology*, 213(1-2), 25-33.
- [14] Choksi S., Patel S., Saluja AK. (2000). Silymarin-a promising herbal hepatoprotector. *Indian Drugs*, 37, 566-569.
- [15] Feng B., Meng R., Huang B., Bi Y., Shen S., Zhu D. (2017). Silymarin protects against renal injury through normalization of lipid metabolism and mitochondrial biogenesis in high fat-fed mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 110, 240-249.
- [16] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- [17] Andrews N. C. The iron transporter DMT1. (1999). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(10), 991-994.