

Efecto de la melatonina en animales intoxicados con plomo

Alejandro Raul Antaño Martínez (1), Minerva Martínez Alfaro (2)

(1) Medicina General, Universidad Autónoma de Querétaro | alexantano@hotmail.com

(2) Departamento de Farmacia, División de ciencias exactas y naturales, Campus Guanajuato | alfarom@ugto.mx

Resumen

La exposición ambiental al plomo es un problema común y puede causar toxicidad acentuada. Las consecuencias incluyen insuficiencia renal y retraso mental. Uno de los mecanismos por los cuales se produce el daño es el aumento en la producción de radicales libres y por lo tanto de estrés oxidativo. Se intoxicaron ratas macho Wistar de 8 semanas de edad con acetato de plomo por vía oral (20 mg/kg/día) durante nueve días al término de los cuales se le administró a un grupo un tratamiento de melatonina (10 mg/kg/día) intraperitoneal durante un mes. Se cuantificaron niveles de glutatión en hígado y cerebro como marcadores de estrés oxidativo. Se encontró que el tratamiento con melatonina posterior a la intoxicación disminuye los niveles de estrés oxidativo en hígado. Se conoce que la melatonina disminuye los niveles de estrés oxidativo mediante dos mecanismos actuando como molécula barreadora o "scavenger" de radicales y mediante la activación de receptores que aumentan la producción de especies antioxidantes. Se desconoce aún si actúan otros mecanismos.

Abstract

Environmental lead exposure is a common problem and can cause serious toxicity. The consequences of such toxicity include renal failure and intellectual disability. One of the mechanisms by which damage occurs is the rise in the production rate of free radicals and therefore in the level of oxidative stress. A single dose of lead acetate (20 mg/kg/d) was administered orally to 8 weeks old Wistar male rats during the course of 9 days. Subsequently one group of rats was treated with a dose of melatonin (10 mg/kg/d) during one month through intraperitoneal injection. Glutathione levels were quantified as a biomarker of oxidative stress in liver and brain samples. Results show that treatment with melatonin posterior to lead intoxication lowers the level of oxidative stress in the liver. Melatonin is known to lower the level of oxidative stress by two different mechanisms: acting like a scavenger molecule and through the activation of production inducing receptors of antioxidant species. It is unknown if other mechanisms play a role in this function.

Palabras Clave

Plomo; melatonina; glutatión; peroxidación lipídica; estrés oxidativo

INTRODUCCIÓN

Plomo

El plomo es un metal pesado con un número de propiedades que lo hacen atractivo para la industria. Tiene una alta densidad, gran maleabilidad y ductibilidad, conduce pobremente la electricidad y posee una alta resistencia a la corrosión (1). Es por lo tanto usado comúnmente en tuberías, baterías, soldaduras, refinación, fundición y como aditivo en la gasolina (2).

A pesar de utilidad se sabe que el plomo causa muchos efectos adversos en la salud. Entre los principales encontramos una importante neurotoxicidad y nefrotoxicidad pero su efecto se presenta también en una variedad de sistemas del organismo (2). Esto ha llevado a un número de restricciones en su uso. A pesar de lo anterior los efectos del plomo entre la población de bajos ingresos y los trabajadores de la industria sigue siendo prevalentes (3). La intoxicación por plomo es por lo tanto un problema actual debido a la amplia distribución de este metal.

Absorción

El plomo se absorbe por medio de la ingestión de alimentos y agua que lo contengan, por medio de la inhalación o por contacto directo con piel y mucosas. Se almacena principalmente en los hueso y ahí tiene una vida media de 17 años. Su excreción es menor a su absorción por lo hay una acumulación neta en el organismo (4).

Toxicidad

El plomo tiene efectos adversos principalmente en el sistema nervioso central, y los riñones (2). La

exposición a altos niveles de plomo en la infancia causa retraso cognoscitivo (3). En los trabajadores industriales el plomo puede causar insuficiencia renal y se ha encontrado un mayor riesgo de padecer carcinoma de células renales (5). Mas aún se observa una mayor mortalidad en cáncer de riñón de trabajadores con exposición laboral (5).

El plomo puede producir daño por medio de mecanismos directos e indirectos. Puede interactuar con enzimas al unirse en los sitios de unión de coenzimas como el zinc y el calcio y por lo tanto impedir la formación su conformación activa (2). Existe igualmente evidencia de que puede inhibir la reparación del ADN (2).

La producción de estrés oxidativo es uno de los mecanismo indirectos de daño del plomo (2,5,6). El estrés oxidativo es un desbalance entre la producción de especies oxidantes y antioxidantes en la célula que favorece a estas últimas (5). Se piensa que el plomo aumenta los niveles de estrés oxidativo al disminuir la producción de óxido nítrico en el riñón (5). Existe también una mayor producción especies reactivas de oxígeno que se piensa se forman de una reacción similar la reacción de Fenton del hierro (2). Sin embargo la mayor producción de radicales libre se da debido a una alteración en las enzimas de la cadena respiratoria dentro de la mitocondria lo cual aumenta la producción de estas moléculas(2).

Glutación

El glutación es un tripeptido presente en las células que actúa como antioxidante. Los niveles de glutación son por lo tanto inversamente proporcional al nivel de estrés oxidativo ya que este último aumenta su consumo. Se pretende usar este biomarcador por lo tanto para cuantificar estrés oxidativo en nuestra muestras.

Melatonina

La melatonina es una hormona secretada por la glándula pineal cuyas funciones más conocidas incluye la regulación del ciclo circadiano y del sistema inmunitario. Se sabe que la melatonina puede reducir el estrés oxidativo actuando como “scavenger” o barredora de radicales libres y mediante la unión a receptores de membrana que activan la señalización para producir especies antioxidantes como el glutatión (2, 5, 6). Igualmente la melatonina puede aumentar la excreción de plomo del cuerpo disminuyendo su toxicidad.

Justificación

Si bien la toxicidad por plomo ha disminuido de manera importante en los países industrializados, sigue siendo un problema importante sobre todo en los niños de bajos recursos y entre los trabajadores industriales en otros lugares (3). Como se ha revisado anteriormente el plomo afecta de manera grave al cerebro en niños y al cerebro en adultos. Debido a que la mayoría de la población mundial aun vive en países en vías de desarrollo es importante el estudio de los mecanismos tóxicos de este metal y métodos para reducirlos. De esta manera se podrá reducir las consecuencias graves de la intoxicación por plomo.

Se pretende por lo tanto determinar si la administración de melatonina en animales intoxicados con plomo disminuye los niveles de estrés oxidativo en hígado y cerebro de animales intoxicados. Para lo anterior se intoxicaron animales con acetato de plomo y se observaron los cambios después de un tratamiento con melatonina. Se determinaron niveles de glutatión en los órganos estudiados para sacar conclusiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron ratas macho Wistar de 8 semanas de edad (271.1 grs promedio peso final) $180 \text{ g} \pm 10$. Se hizo uso de acetato de plomo seigmer grado analítico y melatonina sygma grado analítico para el tratamiento de los animales. Se procesaron las muestras con homogenizador de Glas-Col a 100 rpm y centrifuga refrigerada. Se usó el kit para detección de Glutathion Sygma-Aldrich con el número de catálogo CS0260. Se obtuvieron lecturas espectrofotométricas mediante lector de placas de Elisa

Método

Las ratas se dividieron en 3 grupos, un grupo control, un grupo intoxicado con plomo y tratamiento con melatonina y un grupo intoxicado con plomo solamente. Se les administró durante 9 días: acetato de plomo a 20 mg/ Kg peso diarios por vía oral. Posteriormente después de un descanso de tres días se inició tratamiento con melatonina durante un mes a un solo grupo (10 mg /kg/día).

Se sacrificaron todas las ratas para obtener muestras sanguíneas y extraer hígado y cerebro,.

Preparación de tejidos:

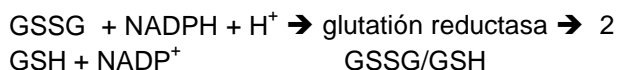
Posterior a la extracción de muestras se lavó el tejido con PBS y se separaron en muestras de .1 grs. La muestra se procesó mediante una precipitación de proteínas. Para ello debe ser desproteinizada con solución de ácido sulfosalicílico al 5% a 5 C° , homogeneizada y posteriormente centrifugada a $10\,000 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ de lo cual se trabaja con el sobrenadante .

Se determinó glutatión como marcador de estrés oxidativo con la siguiente reacción:

Primera etapa: Mezcla de trabajo (glutatión reductasa + DTNB + Buffer) + glutatión estándar



Segunda etapa: solución de NADPH+



Preparación de la curva:

Se realiza solución 50 μM diluyendo 200 veces la solución stock. Se colocan 50 μl de solución 50 μM en el primer pocillo de la curva en microplaca. A partir de este se toman 25 μl del pocillo anterior y se completa con 25 μl de ácido sulfosalicílico.

Una vez que la reacción ha ocurrido se leyó la placa a 412 nm en un lector de placas Elisa para la obtención de los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Se cuantificaron niveles de glutatión en nmol/ml de tejido en los órganos analizados en los tres grupos por medio de un método enzimático espectrofotométrico. Las ratas controles tuvieron los niveles más altos de glutatión. Las ratas que fueron intoxicadas con plomo solamente, mostraron los niveles más bajos; mientras que aquellas intoxicadas con plomo pero que recibieron tratamiento con melatonina tuvieron niveles intermedios. (Tabla 1)

Tabla 1: nmol/ml glutatión

	Control (nmol/ml)	Plomo+ melatonina (nmol/ml)	Plomo (nmol/ml)
Hígado	21.88 +- 0.9 SD	24.80 +- 1.2 SD	12.5 +- 0.8 SD
Cerebro	7.40 +- 0.7 SD	-	3.13 +- 0.6 SD

Discusión

Siguiendo una metodología utilizada en reporte previos (2) se administró una dosis diaria de acetato de plomo por vía oral para inducir estrés oxidativo en los animales de estudio. Mediante la realización del ensayo previamente descrito en la sección correspondiente se cuantificaron niveles bajos de glutatión en ratas intoxicadas con plomo en comparación con ratas control. El glutatión se utiliza como marcador de efecto en la medición de estrés oxidativo ya que es uno de los principales antioxidantes de la célula. Bajos niveles de este antioxidante indican un aumento en su consumo por el aumento en la formación de radicales libre. Se comprueba por lo tanto inducción de estrés oxidativo provocada por la intoxicación por plomo.

Las ratas tratados con melatonina al termino del régimen de intoxicación mostraron niveles de glutatión intermedios entre aquellas que fueron intoxicadas con plomo y las ratas control en el hígado. No se obtuvieron datos reportables de niveles de glutatión en el ensayo de cerebro en ratas tratadas con melatonina. La disminución en el consumo de glutatión indican una menor proporción de radicales libres y por lo tanto una menor cantidad de estrés oxidativo. Se comprueba entonces el rol de la melatonina en la disminución de niveles de estrés oxidativo. Se conocen al menos dos mecanismo mencionados anteriormente de cómo esto sucede. La melatonina actúa como molécula barredora

("scavenger") y aumentando la transcripción, traducción y síntesis de especies antioxidantes. Se desconoce si otros mecanismos actúan en el efecto observado.

La intoxicación por plomo continua siendo una problemática de salud debido a la exposición ambiental y laboral común en ciertas poblaciones. Es de vital importancia por lo tanto encontrar métodos de tratamiento que puedan reducir las consecuencias médicas y de otras índoles. Si bien la melatonina no puede hasta este momento considerarse una opción viable de tratamiento es notable su acción en la reducción de uno de los mecanismos de toxicidad del plomo como lo demuestran nuestros resultados.

CONCLUSIONES

En conclusión se ha demostrado que el tratamiento con melatonina posterior a una intoxicación subaguda con plomo reduce los niveles de estrés oxidativo. La reducción en uno de los mecanismos de toxicidad del plomo podría usarse en pautas de tratamiento futuras.

REFERENCIAS

Bandyopadhyay D et al. (2014). Lead induced oxidative stress: a health issue of global concern. *Journal of Pharmacy Research*, 8(9), 1198-1207.

M. Martínez-Alfaro et al. (2012). Effect of melatonin administration on DNA damage and repair responses in lymphocytes of rats subchronically exposed to lead. *Mutation Research*, 742, 37-42.

Jamieson J.A., Taylor C.G., & Weiler H.A. (2006). Marginal Zinc Deficiency Exacerbates Bone Lead Accumulation and High Dietary Zinc Attenuates Lead Accumulation at the Expense of Bone Density in Growing Rats. *Toxicological sciences* 92(1), 286-294.

Rabinowitz M. (1998). Historical perspective on lead biokinetics models. *Environmental Health perspective*. 106 (6), 1461-1465.

M. Martínez-Alfaro et al. (2013). Melatonin attenuates the effects of sub-acute administration of lead on kidneys in rats without altering the lead-induced reduction in nitric oxide. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 27, 364-369.

E. Hernández-Plata et al. (2015). Melatonin reduces lead levels in blood, brain and bone and increases lead excretion in rats subjected to subacute lead treatment. *Toxicology Letters* 233, 78-83.