

NIVELES DE PROTEÍNAS EN ANIMALES INTOXICADOS CON PLOMO

Ramírez Guerrero Andrea Manoela (1), Martínez Alfaro Minerva (2)

1 [Químico Farmacéutico biólogo, Universidad de Guanajuato] | [am.ramirez.ugto@hotmail.com]

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

Resumen

El plomo es un metal tóxico de uso común que daña sistemas, órganos y tejidos. Tanto la melatonina como la silimarina son dos sustancias con poder antioxidante y su mecanismo es capaz de reducir el estrés oxidativo causado por la producción de radicales libres. Se intoxicaron ratas machos Wistar de 5 semanas de edad con acetato de plomo por vía oral (50 mg/kg/día) durante 4 semanas, al término de este periodo se les administró tratamiento de melatonina (10 mg /kg/día) Intraperitoneal, silimarina (200mg/kg/día) vía oral y silimarina y melatonina de manera simultánea con las mismas dosis, por un periodo de uno y dos meses. Se evaluaron los efectos de la melatonina y silimarina sobre la actividad de caspasa 3 activada en la intoxicación por plomo en hígado, riñón y testículo. Se observa una mayor disminución de caspasa 3 cuando se administra melatonina por si misma en el caso de testículo y riñón. Cuando se trata de hígado el tratamiento que mejor funciona es la silimarina, debido a su propiedad como hepatoprotector. El administrar de forma simultánea silimarina y melatonina no disminuye como se esperaba los niveles de caspasa 3, por lo que es mejor su administración individual.

Abstract

Lead is a commonly used toxic metal that damages systems, organs and tissues. Both melatonin and silymarin are two substances with antioxidant power and its mechanism is able to reduce the oxidative stress caused by the production of free radicals. Male Wistar rats (5 weeks of age) were injected with lead acetate orally (50 mg / kg / day) for 4 weeks at the end of this period were administered intraperitoneal melatonin (10 mg / kg / day) Silymarin (200mg / kg / day) via oral and silymarin and melatonin simultaneously with the same doses, for a period of one and two months. The effects of melatonin and silymarin on the activity of caspase 3 activated in lead intoxication in liver, kidney and testis were evaluated. A greater decrease of caspase 3 is observed when melatonin is administered by itself in the case of testis and kidney. When it comes to liver the treatment that works better is silymarin, because of its property as hepatoprotector. Simultaneous administration of silymarin and melatonin does not decrease as expected levels of caspase 3, so it is better to administer individually.

Palabras Clave

Silimarina; melatonina; caspasa; estrés; oxidativo

INTRODUCCIÓN

Toxicidad del Plomo

El plomo es un metal pesado que posee múltiples propiedades que lo hacen atractivo para la industria. Existen varias fuentes de exposición al plomo, siendo las pinturas la principal. Debido a la actividad industrial y minera también lo es el aire y el suelo. El agua también puede ser una fuente de exposición ya que por mucho tiempo se elaboraron tuberías con aleaciones ricas en plomo, y éstas aún se siguen empleando. La exposición ocupacional y ambiental es un problema de salud a nivel mundial. [1] Diversos reportes indican que el plomo puede causar daño a nivel de los sistemas nervioso central, gastrointestinal, reproductivo, circulatorio, hematológico entre otros. La principal ruta de absorción del metal es la vía digestiva. En ésta vía, la cantidad del metal que es absorbido y retenido en el cuerpo depende de la edad, siendo los niños los que pueden absorber mayor cantidad, alcanzando a absorber hasta un 42% del total ingerido y retener el 32% de éste, mientras que en los adultos estos valores son menores (5-15% de absorción y 5% de retención). Tras la absorción el plomo se distribuye principalmente en sangre y tejidos blandos, en especial hígado y riñón. Al tratarse de un metal no sufre metabolismo alguno. Su principal ruta de eliminación es la vía renal a través de orina y heces fecales, eliminando así dos casi dos tercios del total absorbido. [2]

Al igual que otros metales tóxicos persistentes, el plomo daña los componentes celulares a través de la generación de estrés oxidativo. La producción de especies reactivas de oxígeno, la estimulación de la peroxidación lipídica y el agotamiento de las reservas de antioxidantes se han postulado como los principales responsables de las alteraciones relacionadas con la exposición.

Tratamiento para intoxicación con plomo y antioxidantes como alternativa terapéutica.

La intoxicación por plomo es tratada con diferentes tipos de quelantes que movilizan el metal desde los tejidos a la sangre, para su eliminación por la orina, empleando principalmente EDTA y

dimercaptrol. Se ha reportado que la administración simultánea de un quelante con un antioxidante puede potenciar la efectividad del tratamiento.

- *Melatonina y Silimarina*

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona producida por la glándula pineal. [3]

La silimarina es un producto de estructura flavonoide que se obtiene de los frutos del *Silybum marianum* (L.) Gaerth. [5]

Tanto melatonina como silimarina poseen una excelente actividad antioxidante y se ha comprobado que su uso favorece la reducción del estrés oxidativo bloqueando toxinas y eliminando radicales libres. La melatonina emplea mecanismos que recolectan moléculas reactivas de oxígeno y las de nitrógeno. La silimarina a través de diversos estudios tanto in vitro como in vivo en animales ha demostrado poseer propiedades hepatoprotectoras. [3,4,5]

- *Justificación*

Las intoxicaciones por plomo son un problema de salud pública, sobre todo en sectores pobres de la población, afectando en su mayoría a niños, provocando en ellos daños irreversibles por su neurotoxicidad y nefrotoxicidad sobre todo si dicha intoxicación no se trata a tiempo. Actualmente no existe tratamiento para exposiciones bajas con plomo, y los existentes pueden acarrear consigo más daño que beneficios. De aquí deriva la importancia de conocer los mecanismos intoxicación con plomo y el efecto de tratamientos alternativos con antioxidantes como la silimarina y la melatonina.

Este trabajo pretende evaluar el efecto que tiene la melatonina y silimarina administrados de manera individual y en conjunto sobre la presencia de caspasa 3

activada en un grupo de ratas macho Wistar intoxicadas con plomo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y animales

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: 1) Control: sin tratamiento, 2) PLOMO 1: 50 mg/ kg de Pb administrado por 1 mes, 3) PLOMO 2: 50 mg/ kg de Pb administrado por 2 meses, 4) MELATONINA 1: 10 mg de melatonina/Kg administrado por 1 mes, 5) MELATONINA 2: 10 mg de melatonina/Kg administrado por 2 meses, 6) SILIMARINA 1: 200 mg de silimarina/Kg administrado por 1 mes, 7) SILIMARINA 2: 200 mg de silimarina/Kg administrado por 2 meses, 8) MELATONINA + SILIMARINA 1: 10 mg de melatonina/Kg + 200 mg de silimarina/Kg administrado por 1 mes, 9) MELATONINA + SILIMARINA 2: 10 mg de melatonina/Kg + 200 mg de silimarina/Kg administrado por 2 meses.

Las dosis fueron inyectadas vía oral para plomo y silimarina, y vía intraperitoneal para melatonina.

Al término del tratamiento se procedió a sacrificio de los animales y se extrajo el hígado, riñón y testículos. Inmediatamente se molieron en presencia de nitrógeno líquido y se colocaron en 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 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 homogéneo 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 6.0 de Bio-Rad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existe evidencia de que el estrés oxidativo causado por el plomo, así como otros metales puede desencadenar muerte celular por apoptosis mediada por caspasa 3, por lo que la presencia de esta proteína se evaluó en estos experimentos. En la Tabla 1 se muestran los valores de densitometría para las bandas de caspasa 3 activada, normalizada con GAPDH, obtenidas en testículo, riñón e hígado.

Tabla 1: Grupos de trabajo y tratamiento

Grupo (Tratamiento)	Valores en promedio de la densitometría para las bandas de caspasa 3 activada de tres experimentos.		
	Testículo	Riñón	Hígado
Control	0.36	0.54	0.62
Plomo (1 mes)	0.48	0.88	0.65
Plomo (2° mes)	0.47	0.91	0.83
Melatonina (1 mes)	0.37	0.50	0.37
Melatonina (2° mes)	0.27	0.38	0.27
Silimarina (1 mes)	0.27	0.79	0.26
Silimarina (2° mes)	0.64	0.86	0.28
M+ S (1 mes)	0.46	0.62	0.27
M+S (2° mes)	0.27	0.54	0.29

En testículo (Ver Gráfico 1), la administración de plomo provoca un incremento en la cantidad de caspasa 3 comparado con el control.

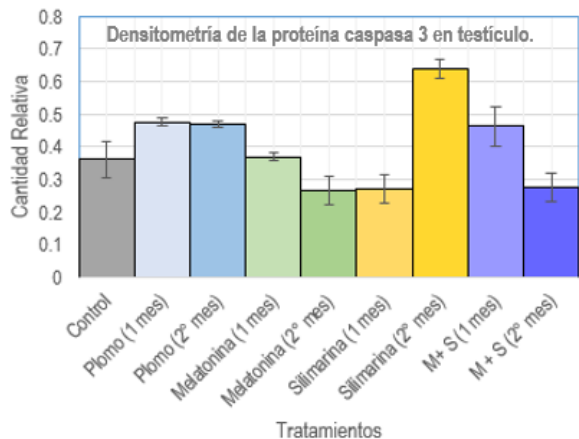


Gráfico 1 : Cantidad relativa de proteína Caspasa 3 en testículo determinada por densitometría.

Los valores más bajos de caspasa 3 se observan en melatonina (2° mes) y silimarina (1 mes), sin embargo en silimarina (2° mes) el valor de caspasa es incluso superior al grupo de plomo. La mezcla de melatonina con silimarina muestra mayor eficacia al administrarse por un periodo mayor.

En riñón (Ver gráfico 2) se obtienen los niveles más bajos de caspasa 3 con el tratamiento de silimarina. Los demás tratamientos respecto al control muestran valores muy elevados de caspasa que incluso se asemejan a los valores de los grupos de plomo. Nuevamente la silimarina al segundo mes alcanza los valores más altos de caspasa 3.

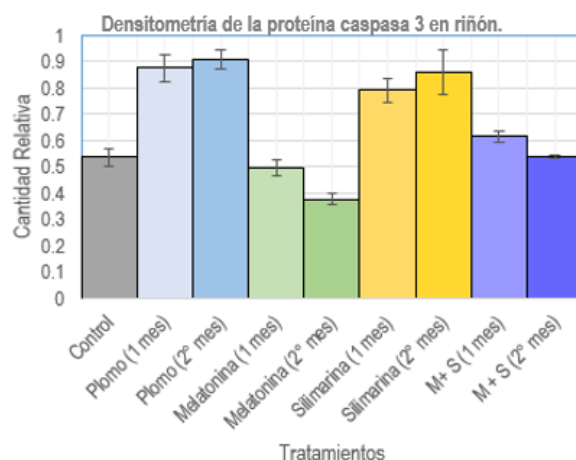


Gráfico 2 : Cantidad relativa de proteína Caspasa 3 en riñón.

Finalmente, al evaluar los valores de la proteína en hígado (Ver Gráfico 3) se aprecia una disminución en la aparición de caspasa 3 en todos los tratamientos propuestos.

En este caso, la silimarina se comporta como se esperaba, disminuyendo los niveles de caspasa 3, comprobando su actividad como hepatoprotector, dando resultados incluso más favorables que la melatonina.

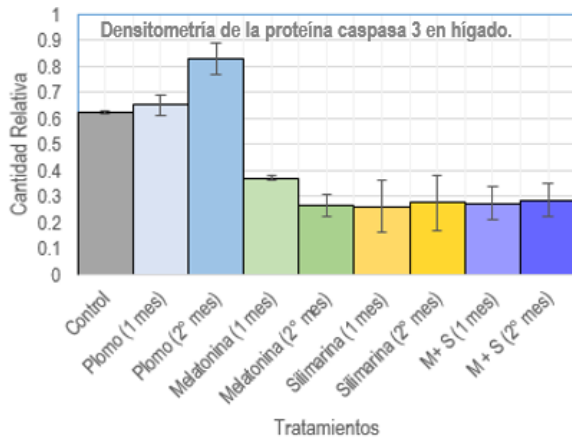


Gráfico 3 : Cantidad relativa de proteína Caspasa 3 en hígado

CONCLUSIONES

La administración de plomo produjo un incremento en la presencia de caspasa 3. La melatonina disminuye la presencia de caspasa 3 activada en todos los órganos evaluados, dando valores incluso menores que el control. La silimarina muestra un efecto protector cuando se administra por un periodo corto de tiempo; cuando se hace de manera prolongada incrementa los niveles de caspasa 3. La administración simultánea de ambos tratamientos es una buena alternativa cuando se busca una mejora a nivel hepático.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Minerva Alfaro Martínez y Dra. Yolanda Alcaráz Contreras por las facilidades brindadas para la elaboración de este trabajo.

Agradezco infinitamente a mi compañera y amiga Dulce Carolina Ruíz Ramírez por su apoyo incondicional y paciencia.

REFERENCIAS

Libro:

Apellidos, A. A. (Año). Título. Ciudad: Editorial. Ejemplo: Cardenosa, G., (2004). Breast Imaging (1st ed.) Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. (Estilo "Referencias", arial narrow 9 pts. justificado ambos lados, Color: gris oscuro)

Capítulo de libro

Apellidos, A. A. & Apellidos, B. B. (Año). Título del capítulo. En A. A. Apellidos (Ed.), Título del libro (pp. xx-xx). Ciudad: Editorial.
Ejemplo: Picó, F. (2004). Arecibo, sol y sereno. En F. Feliú Matilla (Ed.), 200 años de literatura y periodismo: 1803-2003 (pp. 129-134). San Juan: Ediciones Huracán.

Artículo:

1. Debasish Bandyopadhyay, Debosree Ghosh, Aindrila Chattopadhyay, Syed Benazir Firdaus, Arnab Kumar Ghosh, Sudeshna Paul, Debajit Bhowmik, Sanatan Mishra, Krishnendu Dalui, (2014). Lead induced oxidative stress: a Ejemplo: Haner, R. L., Llanos, W. & Mueller, L. (2000). Small volume flow probe for automated direct injection NMR analysis: design and performance. *Journal of Magnetic Resonance*, 143(8), 69-78.
2. Bassem R. M., El -Barbary A., Tousem, E., Aziz S. Di -Mercapto Succinic Acid (DMSA) and vitamin C chelating potency in lead intoxication, regarding oxidative stress and apoptotic related proteins in rabbits. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* (2011) 9, 121 –131
3. 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*,
4. Cárceles, C., Ponferrada, C. Sarljuan, M. A. y Serrano, J. M. 1987. Farmacocinética de la Silimarina Intravenosa en Conejos a dosis única. *An. Vet. (Murcia)* 3 : 11 -15 7. Zhiming Wen, Todd 7 7. E.
5. Dumas, Sarah J. Schrieber, Roy L. Hawke, Michael W. Fried and Philip C. Smith. Pharmacokinetics and Metabolic Profile of Free, Conjugated, and Total Silymarin Flavonolignans in Human Plasma after Oral Adm