

NIVELES DE RNA MENSAJERO DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE METALES EN ANIMALES INTOXICADOS CON PLOMO

Ruíz Ramírez Dulce Carolina (1), Martínez Alfaro Minerva (2), Soto Arredondo Karla Jazmín (3).

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

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

3 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [karlajsa@hotmail.com]

Resumen

La melatonina, una hormona conocida por sus efectos sobre la eliminación de radicales libres y la actividad antioxidante, puede reducir la toxicidad renal y hepática del plomo *in vivo*. Se examinaron los efectos de la melatonina sobre el plomo en la sangre. Las ratas fueron inyectadas por vía intraperitoneal con acetato de plomo (10, 15 y 18 mg/Kg) con y sin melatonina (10 mg/Kg), diariamente por 13 días. Se midieron los niveles de plomo en sangre de los diferentes grupos y se examinaron los niveles de expresión de ZIP8 y ZIP14. La melatonina disminuye los niveles de plomo en sangre por el aumento de las metalotioneínas que son proteínas acarreadoras de metales y también altera los niveles de expresión de ZIP8 y ZIP14 disminuyendo su actividad en la desintoxicación por plomo, posiblemente por la ubicación de estas proteínas y para dar prioridad en estimular otras proteínas como MT.

Abstract

Melatonin, a hormone known for its effects on the Elimination of radical free and antioxidant activity, can reduce the renal and hepatic toxicity of lead in vivo. It examined the effects of melatonin on the blood lead. The rats were injected intraperitoneally with acetate of lead (10, 15, and 18 mg/Kg) with and without melatonin (10 mg/Kg), daily for 13 days. Measured levels of lead in blood of different groups and levels of expression of ZIP8 and ZIP14 were examined. Melatonin reduces the levels of lead in blood by the increase of metallothionein which are metal acarreadoras proteins and also alters the levels of expression of ZIP8 and ZIP14, decreasing its activity in detoxification by lead, possibly due to the location of these proteins and to give priority to encourage other proteins such as MT.

Palabras Clave

Plomo; Melatonina; Radicales libres; Estrés oxidativo

INTRODUCCIÓN

Efectos tóxicos en la salud causados por el plomo.

El plomo es usado en pinturas, tuberías, baterías, soldaduras, refinería, esmaltes y en aditivos de gasolina, etc. Sin embargo, este metal induce efectos adversos a la salud como la nefrotoxicidad [1], activación pro-coagulante en los eritrocitos [2] y efectos neurotoxicológicos [3]. Es considerado como posible carcinógeno humano según la Agencia Internacional para la investigación sobre el cáncer (IARC).

Mecanismo de daño causado por el plomo en proteínas y por radicales libres.

El plomo se une a sitios de unión de las proteínas, compitiendo con los cationes endógenos, principalmente calcio y zinc, alterando la conformación estructural y la actividad biológica de las proteínas, lo que lleva a muchos efectos en las funciones celulares [4]. Además, el plomo lleva a daño por la formación de radicales libres, generando especies reactivas de oxígeno (ROS) y reduciendo los niveles de óxido nítrico [5], provocando estrés oxidativo.

Para eliminar los radicales libres y favorecer la producción de especies antioxidantes esta la melatonina [6].

- *La hormona melatonina en conjunto con el plomo reduce los daños causados por el plomo.*

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona producida por la glándula pineal, tiene muchas funciones como la cronomodulación de sistemas biológicos, regulación de las funciones inmunes, propiedades antioxidantes [7], propiedades antiinflamatorias [8] y la reducción del estrés oxidativo por medio de dos mecanismos: primero, actúa como un recolector de las moléculas reactivas de oxígeno y las de nitrógeno [9] y segundo, mediante sus receptores dependientes en los cuales se incrementan la expresión antioxidante y los receptores independientes que interaccionan con los radicales libres [7].

La melatonina es metabolizada principalmente en el hígado por el citocromo P450 [10].

Estudios demuestran que la administración de la melatonina en conjunto el plomo reduce la toxicidad renal y hepática [11] además de prevenir el daño del ADN en los linfocitos de las ratas [9].

El objetivo de este trabajo es demostrar el efecto del plomo y la melatonina en la expresión de las proteínas transportadoras de metales en hígado y riñón de rata, así como evaluar el efecto del plomo y la melatonina a nivel sanguíneo en ratas machos Wistar.

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 8 grupos: (1) control, (2) 10 mg melatonina/Kg, (3) 10 mg de Pb/Kg, (4) 10 mg de Pb/Kg con 10 mg de melatonina/Kg, (5) 15 mg de Pb/Kg, (6) 15 mg de Pb/Kg con 10 mg de melatonina/Kg, (7) 18 mg de Pb/Kg, (8) 18 mg de Pb/Kg con 10 mg de melatonina/Kg. Las dosis fueron inyectadas vía intraperitoneal por 13 días.

Cuantificación del plomo.

Para la determinación del plomo, el patrón interno (^{115}In y ^{209}Bi) se adiciono (100 μL) a las muestras de sangre (400 μL) y se llevó a cabo una digestión con ácido nítrico concentrado (500 μL) durante 2 horas a 120 $^{\circ}\text{C}$. En el segundo paso, se añadió una alícuota de H_2O_2 (30%, 200 μL) y la mezcla se incubo de nuevo a 120 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Finalmente, la muestra se dejó a temperatura ambiente y el volumen se llevó a 5 mL con agua desionizada para centrifugar y ser introducida n un sistema ICP-MS. Cada análisis se realizó por triplicado y los blancos por duplicado. Se utilizó un espectrofotómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (Modelo 7500ce; Agilent Technologies) con un nebulizador Meinhard y una cámara de pulverización Peltier (2 $^{\circ}\text{C}$). Las condiciones de funcionamiento instrumentales fueron los siguientes: potencia hacia delante, 1500 W; velocidad de flujo de gas de plasma, 15 L / min; caudal del gas portador, 0,89 L / min; caudal de gas,

0,15 L / min; profundidad de muestreo, 10 mm; el tiempo de permanencia, 300 ms por isótopos; Se utilizaron muestras de platino y conos skimmer. Los isótopos ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb fueron controlados y estandarizados para ^{115}In y ^{209}Bi . La calibración se realizó con los estándares comerciales de Agilent en las concentraciones de plomo de 0, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 5.0 y 10 $\mu\text{g/L}$, con los estándares internos, Bi y In (5,0 $\mu\text{g/L}$ cada uno). El límite de detección de plomo fue de 0,02 mg/L.

Aislamiento del ARN y síntesis de cDNA

Los animales se anestesiaron para obtener la muestra de sangre y posteriormente sacrificados para recuperar hígado y riñón. El RNA se aisló de cada órgano acorde las instrucciones del kit de Promega y la concentración del RNA fue medido por espectrometría en un Nanodrop (Epoch) y las muestras fueron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior uso. Para la síntesis de cDNA se usó el kit transcriptasa reversa III (Invitrogen) acorde a las instrucciones del mismo.

PCR en tiempo real (RT-PCR)

La RT-PCR para las reacciones de ZIP8 y ZIP14 fue realizada en el termo ciclador, Sistema tiempo-real CFX96 (Bio-Rad). La eficiencia de amplificación fue determinada por una curva estándar, usando diluciones seriadas de la muestra de cDNA. La RT-PCR se realizó con el kit RT-PCR SYBR Green/ROX; cada reacción contenía 5 μL de una dilución 1:100 de cDNA, 5 μL de la mezcla maestra, 270nM de cada oligonucleótido iniciador y la DNA polimerasa y el reactivo SYBR Green. La temperatura de alineamiento para ambos genes fue de $64\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada producto de PCR fue amplificado por triplicado y la Ct (ciclo de amplificación) fue el promedio de lo obtenido y el nivel de expresión de cada gen se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ [12]. La expresión de la proteína ribosomal, S18 (Rps18), fue usada para determinar los valores de Ct junto con los resultados del grupo 1 (control), de esta manera se normalizaron los valores para obtener los valores de $\Delta\Delta\text{CT}$. Por lo tanto, nuestros resultados se expresan como el cambio veces de la expresión génica en relación con Rps18 y el grupo de control

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles de plomo obtenidos en sangre se muestran en la tabla 1

Tabla 1

Tratamientos	Datos	
	Promedio de Pb ($\mu\text{g/ml}$)	Desviación estándar de Pb ($\mu\text{g/ml}$)
1. Control	0.028	0.004472136
2. 10 mg melatonina	0.03	0
3. 10 mg/Kg Pb	2.285	0.035355339
4. 10 mg/Kg Pb con melatonina	1.75	0.353553391
5. 15mg/Kg Pb	2.82	0.169705627
6. 15 mg/Kg Pb con melatonina	1.6	0.08
7. 18 mg/Kg Pb	3.765	0.374766594
8. 18mg/Kg Pb con melatonina	3.21	0.21

La concentración de plomo ($\mu\text{g/ml}$) detectada en sangre es congruente con las dosis administradas de 10, 15 y 18 mg/Kg Pb, los valores de los grupos con la administración solamente de plomo aumentaron significativamente en comparación con el grupo control. Estas concentraciones de plomo bajan significativamente al ser aplicadas junto con la melatonina (Fig. 1), ya que la melatonina, aumenta la expresión de proteínas ligantes de metales así como atenúa los efectos tóxicos por la reducción de los radicales libres y de las especies

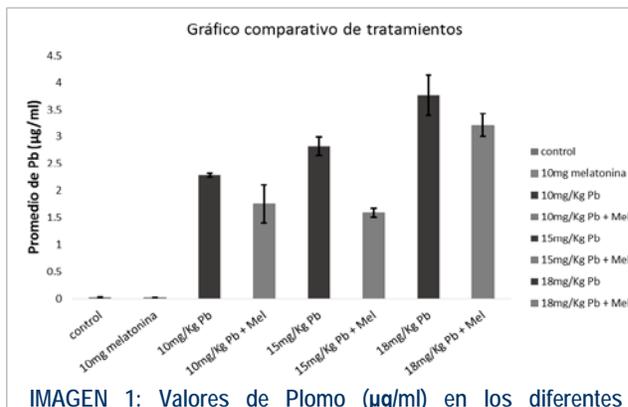


IMAGEN 1: Valores de Plomo ($\mu\text{g/ml}$) en los diferentes tratamientos. En gris oscuro los tratamientos de plomo sin melatonina y en gris claro los tratamientos con melatonina.

reactivas generadas por el plomo. Las proteínas ligantes de metales que aumentan con la administración de la melatonina son las

metalotioneínas, estas proteínas transportan al plomo del hígado al riñón para su eliminación a través de la orina [13]. Entonces, a mayor concentración de melatonina habrá mayor cantidad de metalotioneínas y por lo tanto la cantidad de plomo en sangre será menor, ya que está siendo eliminado.

La expresión de estas proteínas, las metalotioneínas (MT1-MT2), fue medida en estudios anteriores por el grupo de trabajo de la Dra. Minerva, y como se esperaba, la expresión aumento significativamente al administrar la melatonina, esto en dosis bajas (10 mg/Kg) y altas (20 mg/Kg) de plomo (Imagen 2) [13].

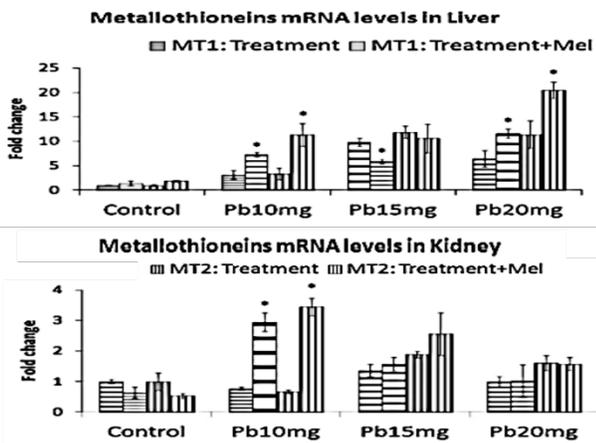


IMAGEN 2: Niveles de mRNA de MT1 y MT2 en hígado y riñón de ratas intoxicadas con plomo.

Los niveles de expresión obtenidos de las proteínas Zrt y Irt (ZIP) tanto en hígado como en riñón mostraron diferencias a los de MT1 y MT2. En hígado, los grupos que fueron tratados con plomo y melatonina bajaron la expresión (Imagen 3), en

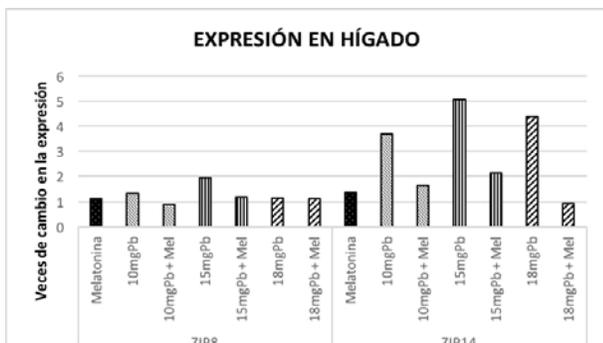


IMAGEN 3: Niveles de expresión de ZIP8 y ZIP14 en hígado de ratas intoxicadas con plomo.

general la expresión de ZIP8 y ZIP14 es un poco más baja a la mostrada en estudios anteriores de MT1 y MT2. Para el caso del riñón, ZIP8 se expresa un poco más cuando se administra el tratamiento junto con melatonina en concentraciones bajas (10 mg/Kg) y medias de plomo (15 mg/Kg), en concentraciones altas (18 mg/Kg) la expresión baja significativamente. ZIP14 en riñón tiene un comportamiento similar que en hígado, cuando se administra melatonina la expresión baja en todos los grupos (Imagen 4).

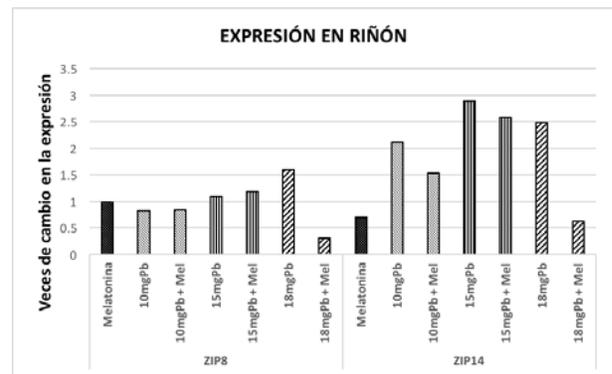


IMAGEN 4: Niveles de expresión de ZIP8 y ZIP14 en riñón de ratas intoxicadas con plomo.

Ambas proteínas transportadoras de metales, ZIP8 y ZIP14, aumentan su expresión en los controles con melatonina tanto en hígado como en riñón.

Estas variaciones de expresión en ZIP8 y ZIP14 comparando con MT1 y MT2 cuando es administrada melatonina, posiblemente se deba a sitio donde se encuentran, MT es una proteína citoplasmática y ZIP es una proteína transmembranal. Cuando la célula es intoxicada con plomo, pareciera ser que, la melatonina aumenta únicamente la expresión de las proteínas acarreadoras de metales que están en el citoplasma para eliminar la mayor concentración posible de metal no esencial y así evitar un efecto adverso a la salud. De manera contraria, disminuye la expresión de las proteínas transmembranales para que, probablemente, dejen de ingresar plomo a la célula y la concentración no pueda seguir aumentando.

CONCLUSIONES

El plomo aumenta la expresión de las proteínas transportadoras de metales tanto en hígado como

en riñón de rata, ZIP8 y ZIP14 bajan su expresión cuando la melatonina es adicionada al tratamiento posiblemente por la ubicación de estas proteínas. El aumento de la expresión de estas proteínas ayuda a bajar la concentración de plomo que se encuentra en las ratas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Doctora Minerva Martínez por la gran oportunidad de permitirme trabajar en su laboratorio y poder mejorar mis habilidades en el ámbito profesional, por la confianza y el apoyo para poder llevar a cabo el proyecto, así como su tiempo dedicado para mi desarrollo. También agradezco a la Dra. Karla Soto quien me acompañó en todo el tiempo en el proyecto y me ayudó a tener más confianza dentro del laboratorio, por su conocimiento, apoyo incondicional y humildad ante todo.

REFERENCIAS

[1] 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 function in Korean lead workers. *Environ. Health Perspect*, 113(1), 36-42.

[2] Shin J. H., Lim K. M., Noh J. Y., Bae O. N., Chung S. M., Lee M. Y., & Chung J. H. (2007). Lead-induced procoagulant activation of erythrocytes through phosphatidylserine exposure may lead to thrombotic diseases. *Chem. Res. Toxicology*, 20(1), 38-43.

[3] 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.

[4] Godwin H. A. (2001). The biological chemistry of lead. *Curr. Opin. Chem. Biol*, 5(2), 223-7.

[5] Dotan Y., Lichtenberg D., & Pinchuk I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res*, 43(3), 200-27.

[6] 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>

[7] Bonnefont-Rousselot D., & Collin F., (2010). Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 278(1), 55-67.

[8] Carpentieri A., Díaz de Barboza G., Areco V., Peralta Lopez M., & Tolosa de Talamoni N. (2013). New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res*, 65(4), 437-44. doi: 10.1016/j.phrs.2012.01.003

[9] Sliwinski T., Rozej W., Morawiec-Bajda A., Morawiec Z., Reiter R., & Blasiak J. (2007). Protective action of melatonin against oxidative DNA damage: chemical inactivation versus base-excision repair. *Mutat Res*, 634(1-2), 220-7.

[10] Tan D. X., Manchester L. C., Terron M.P., Flores L.J., & Reiter, R.J., (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res*, 42(1), 28-42.

[11] G. H. El-Sokkary., G. H. Abdel-Rahman., & E. S. Kamel, Melatonin protected against lead-induced hepatic and renal toxicity in male rats. *Toxicology*, 213(1-2), 25-33.

[12] Schmittgen K. J. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* 25, 402-408.

[13] Hernández P. E., Quiroz C. F., Ramírez G. G., Yáñez B. E., Rodríguez M. M., Flores A., Wrobel K., Wrobel K., Méndez I., Díaz M. M., Robles J. & Martínez A. M. (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.