

## **EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN A PLOMO DURANTE LA GESTACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DE METALOPROTEASAS EN PLACENTA DE RATONES BALB/C.**

SOSA-ROBLEDO G.<sup>1</sup>, FIGUEROA-SALCIDO C.<sup>1</sup>, LEVARIO-CARRILLO M.<sup>2</sup>, MELENDEZ-PIZARRO C.<sup>1</sup>, INFANTE RAMIREZ. R.<sup>1</sup>, EROSA DE LA VEGA G.<sup>1</sup>. GONZÁLEZ-HORTA C.<sup>1</sup>, SÁNCHEZ-RAMÍREZ B.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Lab. Biotecnología, Fac. Ciencias Químicas. UACH. Apdo. postal 1542-C Chihuahua, Chih., México. Tel/Fax (614)4-14-44-92. <sup>2</sup>Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica. IMSS. Email: bsanche@uach.mx

### **RESUMEN**

Las metaloproteasas (MMPs) forman una familia de enzimas homologas estructurales las cuales se distinguen por tener un dominio catalítico el cual contiene un átomo de zinc (Zn) unido por tres histidinas conservadas y una cisterna; estas participan activamente en el proceso de implantación y remodelación tisular. El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de la exposición a plomo durante la gestación sobre la actividad de la MMP-2, la MMP-9, y sus respectivos zimógenos, en placenta de ratones Balb/c. Los grupos de estudio se conformaron por hembras (n=4) expuestas a una dosis única de acetato de Pb trihidratado (56 mg/kg) al octavo día de gestación, y por hembras gestantes sin exposición (n=6). Las hembras fueron sacrificadas al día 18 de gestación, los órganos maternos (hígado, bazo y riñones), placentas y fetos fueron extraídos, el peso de cada uno de ellos fue registrado. Las placentas se almacenaron en solución salina estéril a -20°C, posteriormente 20 placentas de cada grupo se seleccionaron al azar para realizar la extracción de proteínas y determinar la actividad de las MMPs mediante zimografía. La actividad se cuantificó analizando el área de cada una de las bandas de degradación. Los resultados se analizaron estadísticamente para identificar el nivel de actividad de las enzimas entre el grupo expuesto y el control. No se encontró diferencia significativa en el peso de las hembras al día de sacrificio, ni en el número de fetos viables entre grupos. Únicamente en el peso de los riñones se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo con control. La actividad de la MMP-9 y de su zimógeno se encontró disminuida en las placentas expuestas ( $p < 0.01$ ) en comparación con la actividad observada en las placentas control. La actividad de la pro-enzima -2 (pro-MMP-2) tuvo un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) mientras que para la enzima activa (MMP-2) no hubo diferencia significativa entre los grupos. Nuestros resultados muestran que la exposición a una sola dosis de Pb provoca alteraciones en la actividad de estas enzimas a nivel placentario, dichos cambios pueden ser resultado de mecanismos orientados a regular la actividad de las enzimas para mantener la funcionalidad de este tejido y por ende la supervivencia del feto.

### **ANTECEDENTES**

El plomo es un metal pesado muy utilizado en la elaboración de numerosos productos comerciales, el cual tiene múltiples efectos tóxicos en el organismo. Se considera que niveles menores a 10  $\mu\text{g/dL}$  (NOM-EM-004-SSA1-1999) producen manifestaciones clínicas. Los efectos del plomo en la reproducción ha sido objeto de estudio desde

hace varios años. La placenta cumple con funciones fundamentales para el desarrollo del embrión y está involucrada en la protección del feto contra agentes tóxicos. Sin embargo, el plomo logra atravesar la barrera placentaria encontrándose que cantidades significativas son transferidas al feto. Estudios experimentales de exposición aguda a plomo durante la gestación, a dosis no letales para la madre, mostraron daño importante en la placenta (Fuentes y cols., 1996); dicho daño se sugiere pudiera involucrar la actividad de las enzimas MMPs. La MMP-2 y -9 pertenecen a un grupo de enzimas que degradan gelatina, colágeno y laminina. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la exposición a Pb durante la gestación sobre la actividad de MMPs en placenta de ratones Balb/c.

## **MATERIALES Y METODOS**

### *Animales y exposición a plomo*

Dos grupos de ratones hembras de la cepa Balb/c fueron expuestas en el 8vo. día de gestación a 0 (n=5) y 56 (n=4) mg/Kg de peso corporal de acetato de plomo trihidratado vía intraperitoneal. A los 18 días de gestación las hembras se sacrificaron y los productos fueron pesados y observados macroscópicamente. Las placentas fueron pesadas, examinadas y congeladas a -20°C en SSF estéril hasta su uso.

### *Zimografía*

Veinte placentas de cada grupo se seleccionaron al azar para cuantificar la actividad de las MMPs en geles con sustrato. Una muestra de 150 mg de placenta murina se maceró en 0.5 ml de amortiguador de homogenización; el homogenado se incubó por 2 h a 4°C para después centrifugarlo a 10,000 rpm durante 10 min. 15 µg de proteína se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% con 1% de gelatina de bovino como sustrato. La actividad de las MMPs se determinó incubando el gel durante 18 h a 37°C en amortiguador de incubación, concluida ésta, se tiñó el gel con Azul de Comasie por 1h y posteriormente se realizaron lavados con solución desteñidora (metanol al 30% y ácido acético al 10%) para el revelado de las bandas de degradación. La actividad de la enzima en el gel se cuantificó utilizando el software Image-Pro Plus V.4.1, mediante el cual se determinó el área de degradación del sustrato en cada banda. El peso molecular de la enzima se determinó mediante el corrimiento de marcadores de peso molecular.

## **RESULTADOS**

En este estudio se analizaron un total de 10 hembras donde 6 pertenecieron al grupo control y 4 al grupo expuesto a Pb, obteniendo un total de 96 placentas y 97 fetos, ya que una hembra control presentó gemelos univitelinos. Los parámetros gestacionales de los productos al término se describen en el Cuadro 1.

De acuerdo al análisis estadístico, el peso de los órganos maternos (placenta, bazo e hígado) no mostró diferencia significativa atribuible a la exposición a Pb, solo se encontró diferencia significativa en el peso de los riñones de las hembras del grupo expuesto ( $p < 0.05$ ). De igual manera no se observó diferencia significativa en cuanto al incremento de peso materno al término de la gestación ( $p > 0.05$ ). La evaluación del número y peso de fetos vivos y muertos, tanto del grupo expuesto como del grupo control resultó sin diferencia significativa entre ambos grupos.

**Cuadro 1.** Parámetros gestacionales de los productos al término.

Peso (g)	Control $\bar{X} \pm SD$	Expuesto a Pb $\bar{X} \pm SD$	p
Placenta	0.144 $\pm$ 0.016	0.145 $\pm$ 0.022	0.075
Fetos	1.309 $\pm$ 0.119	1.258 $\pm$ 0.205	0.34
Hígado	2.872 $\pm$ 0.610	3.412 $\pm$ 0.414	0.24
Bazo	0.137 $\pm$ 0.024	0.204 $\pm$ 0.053	0.07
Riñones	0.232 $\pm$ 0.029	0.328 $\pm$ 0.063	0.04

Ratones hembras inoculados intraperitonealmente con acetato de Pb trihidratado en una proporción de 56 mg/Kg al octavo día de gestación.

La actividad gelatinolítica de los homogenados de placenta mostró 4 bandas con pesos moleculares de 92, 82, 72 y 65 kDa. Las bandas correspondieron a la pro-MMP-9, MMP-9, pro-MMP-2 y MMP-2 respectivamente. La actividad gelatinolítica se analizó de acuerdo al área de degradación utilizando curva estándar realizada con cantidades conocidas de colagenasa tipo 2. Los resultados mostraron un decremento significativo en la actividad de la pro-enzima MMP-9, así como de la MMP-9 ( $p < 0.01$ ) en las placentas de las hembras expuestas a Pb en relación con las hembras control. Al realizar el análisis estadístico, no se encontró diferencia significativa para la MMP-2 ( $p > 0.05$ ) en las muestras de hembras expuestas a Pb en comparación con el control. Sin embargo, un incremento significativo en la actividad de la pro-MMP-2 se observó en la placenta del grupo expuesto a Pb.

## DISCUSIÓN

Los resultados encontrados en este estudio muestran que la exposición a una dosis única de Pb al octavo día de gestación no provocó un cambio significativo en los pesos de placentas, fetos, y órganos maternos. Estos resultados son similares a los reportados por Fuentes y cols. (1996). La actividad de la pro-MMP-9 y MMP-9 mostró un decremento significativo, en tanto que la actividad de la pro-MMP-2 mostró un aumento significativo en la placenta de hembras expuestas a Pb comparadas con las del grupo control; la MMP-2 se mantuvo igual en los dos grupos de estudio en la actividad de dichas enzimas. Estos resultados están acordes a lo obtenido por Caraveo Borunda (2007) quien reportó un incremento significativo en la expresión de la MMP-2 en placentas expuestas a Pb mediante inmunohistoquímica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Caraveo Borunda, L. 2007. Evaluación de los cambios morfológicos y la expresión de MMPs -2, -9 y del inhibidor tisular -2 de MMPs en placenta de ratones Balb/c expuestos a Pb durante la gestación. Tesis de maestría en ciencias en biotecnología. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Marzo del 2007
2. Fuentes M., Torregosa A., Mora R., Götzens V., Corbella J., Domingo J.L. 1996 Placental Effects of Lead in Mice. *Placenta* 17(1), 371-376.