



Estudios preliminares de los posibles cambios estructurales y/o funcionales en la hemoglobina durante su interacción con p,p'-DDT.

**Jorge Uzcátegui^{1*}, Silvia Contreras¹, Iván Avendaño¹, Johanna Peña¹, Alí Sulbarán¹,
Dariana Erazo¹, Richart Mejías², Reinaldo Zambrano³.**

¹Laboratorio de Físicoquímica Orgánica. Departamento de Química. Facultad de Ciencias.
Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela.

²Cátedra de Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela.

³Grupo Multidisciplinario de Investigaciones Odontológicas. Facultad de Odontología.
Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela

(*) jorevzca@ula.ve

Recibido: 01/16/2015

Revisado: 10/08/2015

Aceptado: 30/08/2015

Resumen

Se realizó un estudio preliminar de los cambios observados durante la posible interacción entre la hemoglobina y el plaguicida organoclorado p,p'-diclorodifeniltricloroetano (p,p'-DDT). En los ensayos cinéticos realizados se emplearon las técnicas de espectroscopía UV/Visible y cromatografía de gases para monitorear cambios de absorbancia de la hemoglobina y la concentración de p,p'-DDT. Los resultados mostraron que la señal UV de la hemoglobina cambia a través del tiempo debido a la presencia del p,p'-DDT, a medida que la concentración del plaguicida aumenta. El efecto de interacción observado se ve disminuido cuando se usa 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). El mismo resultado se observó en cinco muestras de sangre humana.

Palabras claves: pesticidas; p, p-DDT; hemoglobina; cromatografía de gases; interacción hemoglobina/plaguicidas

Abstract

A preliminary study of the possible changes of hemoglobin during the interaction with the organochlorine pesticide p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane (p,p'-DDT) was performed. Kinetic studies were analyzed using UV/Visible spectroscopy and gas chromatography techniques to monitor changes in absorbance of hemoglobin and p,p'-DDT concentration. The results showed that hemoglobin UV signal undergoes changes over time due to the presence of p,p'-DDT as the pesticide concentration increases. The interaction effect observed diminished when 2,3-bisphosphoglycerate (2,3-BPG) is used. The same results were observed in five samples of human blood.

Keywords: Pesticides; p,p-DDT, Hemoglobin; Gas chromatography; Hemoglobin/pesticide interaction

Introducción

Los organoclorados conforman un grupo de pesticidas de origen sintético desarrollados principalmente para controlar las poblaciones de insectos plaga. No obstante, algunos de estos insectos presentan resistencia a los órgano-clorados, principalmente al DDT¹. Los plaguicidas organoclorados (OCs) se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente terrestre y acuático, como resultado de que en las últimas décadas han sido utilizados constantemente para combatir plagas en la industria, la agricultura, e incluso durante las campañas de salud donde fueron aplicados para contrarrestar enfermedades como la malaria. Sus propiedades físicoquímicas los hacen muy resistentes a la degradación biológica, por lo que son altamente persistentes².

Como consecuencia, estos contaminantes representan una

seria amenaza para la salud pública y para la mayoría de las formas de vida. Por esta razón, actualmente, el uso de plaguicidas órgano-clorados se encuentra prohibido^{3,4}. Aunque muchos ensayos clínicos evidencian la toxicidad de los plaguicidas órgano-clorados, el mecanismo exacto por el cual ocurre la función toxicológica en el organismo no se conoce con claridad. Por el contrario sus implicaciones si están bien documentadas. Debido a esto, en estos últimos años numerosos estudios en el área se centran en detallar los mecanismos de acción involucrados y a su vez en descubrir otras implicaciones de importancia, que puedan poner en peligro de algún modo la salud o calidad de vida a largo plazo⁵. De aquí surge la importancia de entender cómo interactúan estos OCs a nivel molecular con las proteínas del organismo, para de esta manera conocer si existe algún tipo de reacción, adsorción o inhibición de alguna proteína o enzima y conocer a qué otro tipo de

patologías están propensas las personas contaminadas con plaguicidas. En la presente investigación se plantea estudiar, *in vitro*, las interacciones que podrían establecerse entre el p,p'-DDT y la hemoglobina. Para estudiar dichas interacciones se propone utilizar a la hemoglobina como biomarcador. La evolución de los cambios que podrían darse tanto en la hemoglobina como en el plaguicida se analiza mediante las técnicas de espectroscopia UV-Visible y cromatografía de gases.

Materiales y métodos

Se utilizó hemoglobina humana liofilizada Sigma, p,p'-DDT patron100 mg/L AccuStandard EUA, buffer trizma-base y cloruro de sodio Fluka Chemic AG. Se usaron además acrodiscos Sterile-EO 0,20 µm, cartuchos Accubond SPE ODS-C18 500 mg.

Hemoglobina/p,p'-DDT:

Se prepararon soluciones de hemoglobina $9,3 \times 10^{-2}$ mM / p,p'-DDT (20-60) µg/L en solución de NaCl 0,15 M, buffer trizma 10 mM y pH 7,30, se filtraron con acrodiscos Sterile-EO 0,20 µm, luego se le midió la absorbancia a 415 nm cada 24 horas en un espectrofotómetro UV/Visible Perkin Elmer LAMBDA 2. Las mezclas de reacción permanecieron en un baño termostatzado a 37 °C. Se procedió a extraer el p,p'-DDT mediante la técnica de extracción en fase sólida. El cartucho se acondicionó pasando a través del absorbente 5 mL de metanol, luego 5 mL de una mezcla hexano:acetato de etilo (2:1) y por último 3 mL de agua desionizada. Las retención de los analitos se realizó pasando 5 mL de la solución que contenía la mezcla de reacción por el cartucho. Luego se agregan 2 porciones de 5 mL de agua destilada, para eliminar posibles interferentes. Por último, la elución del p,p'-DDT se realizó con 5 mL de la mezcla hexano:acetato de etilo (2:1). La humedad del eluato se elimina agregando sulfato de sodio anhidro. Se filtra y se concentra hasta sequedad. Posteriormente se reconstituye en 1 mL de hexano. El procedimiento se aplicó para todas las demás soluciones de hemoglobina- p,p'-DDT. Se repitió el mismo procedimiento anterior pero se le agregó solución de 2,3-DPG 0,04 M.

Sangre / p,p'-DDT 60 µg/L

Se utilizaron muestras de sangre de cinco personas voluntarias, Esta fue dividida en 2 porciones de 4 mL en 2 tubos vacuum esterilizados que contenían heparina, siendo una el blanco o testigo a la que se le agregó una solución de NaCl 0,15 M / buffer trizma 10 mM pH 7,3 y el otro tubo fue dopado con la solución patrón de p,p'-DDT a una concentración de 60 µg/L, Las mezclas de reacción permanecieron en un baño termostatzado a 37 °C. Se les midió la absorbancia a 415 nm cada 24 horas para cada tubo. Finalmente se procedió a la extracción en fase sólida del suero sanguíneo con cartuchos Accubond SPE ODS-C18 500 mg y se analizó por cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo de gases marca VARIAN 3.800 con detector ECD.

Resultados y discusión

En la figura 1 se observa una disminución de la absorbancia de la hemoglobina en el transcurso del tiempo. Esta disminución es mayor a medida que se va incrementando la concentración de p,p'-DDT. Por lo tanto, la interacción hemoglobina-p,p'-DDT es mayor en los experimentos realizados a mayores concentraciones de p,p'-DDT. El hecho de que ocurran cambios en la absorbancia de la hemoglobina solo en presencia del p,p'-DDT es un indicio de interacción entre la hemoglobina y el p,p'-DDT. No obstante, la naturaleza de la interacción que pudiera estar implicada, bien sea física o química, está fuera del alcance de esta técnica, ya que cambios en la absorbancia pueden ocurrir por cambios estructurales de la proteína.

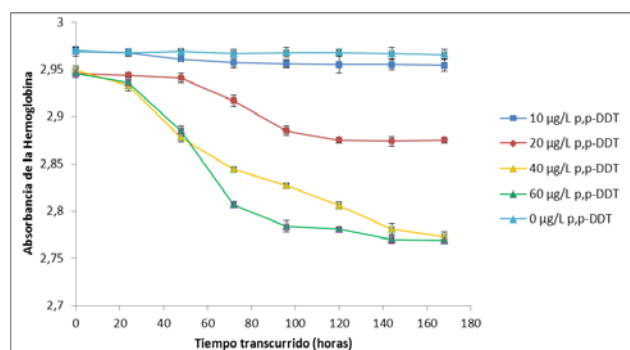


Fig. 1: Absorbancias de la cinética de la hemoglobina /p,p'-DDT (10, 20, 40 y 60 µg/L.

Se encontró que el 2,3-DPG disminuye el efecto de la variación de la absorbancia de la hemoglobina ocasionado por la presencia del p,p'-DDT en el medio, lo cual puede atribuirse a una competencia entre el 2,3-DPG y el p,p'-DDT en la cavidad de la hemoglobina. Además, se pudo observar que la concentración de p,p'-DDT que queda sin interaccionar es mayor cuando está presente el 2,3-DPG. En el experimento realizado con muestras de sangre en presencia de p,p'-DDT 60 µg/L, la absorbancia de la hemoglobina muestra una disminución respecto al blanco y respecto a la absorbancia de la muestra al inicio del experimento.

A través de la técnica de cromatografía de gases, se determinó la concentración de p,p'-DDT libre en el suero sanguíneo, la cual representa la fracción de p,p'-DDT que no interaccionó en la sangre. En la tabla 1, se presentan los valores de concentración p,p'-DDT al inicio del experimento y luego de transcurridas 144 horas.

Tabla 1: Valores de concentración de p,p'-DDT sin interaccionar en el experimento sangre/p,p'-DDT 60 µg/L.

Voluntario	Concentración de p,p'-DDT (µg/L)	
	Inicio	144 horas
V1	60	12
V2	60	10
V3	60	7
V4	60	13
V5	60	9

Conclusiones

A través de experimentos *in vitro*, se logró obtener evidencias de interacción entre la hemoglobina y el plaguicida órgano-clorado p,p'-DDT mediante el uso de las técnicas de espectroscopia UV/visible y cromatografía de gases.

Se encontró una disminución en la absorbancia de la hemoglobina, en presencia del plaguicida órgano-clorado p,p'- DDT, con respecto al tiempo reacción. Además, la concentración de p,p'-DDT también disminuye en el transcurso del tiempo.

Los ensayos cinéticos realizados en presencia del compuesto 2,3-DPG muestra una disminución en la interacción entre la hemoglobina y el plaguicida órgano-clorado p,p'-DDT.

Los experimentos llevados a cabo con muestras reales de sangre muestran disminuciones en los valores de absorbancias de la hemoglobina y concentración de p,p'-DDT.

Referencias

1. S Xue, Health effects of pesticides. A review of epidemiologic research from the perspective of developing nations. **American Journal of Industrial Medicine**, **12**, 269-279 (1987).
2. L Calva, M Torres. Plaguicidas Organoclorados. **ContactoS**, **30**, 35-46 (1998).
3. E Pitarch. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas (Tesis doctoral). Universidad Jaime I. España (2001).
4. O López. Influencia de la exposición crónica a plaguicidas sobre diversos marcadores bioquímicos (esterasas y enzimas antioxidantes) en trabajadores de invernadero de la costa oriental de Andalucía (Tesis doctoral). Universidad de Granada. España. (2005).
5. H Gil, J Uzcategui. Isotope Effects in the Nonenzymatic Glycation of Hemoglobin Catalyzed by DPG. **Actualidades de Físicoquímica Orgánica**, **1**, 109-121(1993).

