

150
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

PROTECCION POR DIVERSOS FARMACOS SOBRE
LA NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR $HgCl_2$

TESIS DE LICENCIATURA

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

HORACIO REYES VIVAS

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE DE 1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pag.
ABREVIATURAS -----	I
RESUMEN -----	II
INTRODUCCION -----	I
* Membranas biológicas -----	4
* Metabolismo del Ca^{2+} en mitocondrias -----	9
* Metabolismo del mercurio -----	14
* Características del dietilditiocarbamato -----	17
* Características de la albúmina sérica -----	17
OBJETIVOS -----	20
MATERIAL Y METODOS -----	21
* Material biológico -----	21
* Aislamiento de mitocondrias -----	21
* Determinación de la concentración de proteína -----	23
* Oximetría -----	24
* Transporte de calcio -----	24
* Potencial transmembranal -----	25
* Determinación de grupos SH libres -----	25

* Determinación de la concentración de calcio total	26
* Transferencia de $^{203}\text{Hg}^{2+}$ por el DDC a una fase orgánica (butanol-tolueno)	27
* Determinación de la unión de $^{203}\text{Hg}^{2+}$ a mitocondrias	27
* Retención de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	28
RESULTADOS	29
* Determinación del complejo Hg-DDC	29
* Efecto <i>in vivo</i> del DDC sobre la intoxicación renal producida por mercurio	29
* Estudio <i>in vitro</i> del DDC sobre el efecto tóxico mercurial	40
* Estudio <i>in vitro</i> de la BSA sobre el efecto tóxico mercurial	43
DISCUSION	47
CONCLUSIONES	50
PERSPECTIVAS	51
BIBLIOGRAFIA	52

ABREVIATURAS

BSA: Albúmina Sérica de Bovino.

DDC: Dietilditiocarbamato.

DTNB: Acido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico.

EDTA: Acido etilendiaminotetracético.

HEPES: Acido N-(2-hidroxietyl) piperazina-N'-(2- etanosulfónico)

$\Delta\Psi$: Potencial transmembranal.

TRIZMA: Tris(hidroxietyl)aminometano.

RESUMEN

Uno de los órganos más afectados en la intoxicación por Hg^{2+} es el riñón. A nivel celular, el organelo que se encuentra más alterado es la mitocondria, la cual pierde su actividad fosforilante, respiratoria, y la capacidad de transportar calcio. El daño mitocondrial por Hg^{2+} está íntimamente ligado a la pérdida de la regulación del Ca^{2+} a nivel mitocondrial y al aumento en la permeabilidad membranar en dicho organelo.

En este trabajo, se analizó el efecto del dietilditiocarbamato (DDC) para reducir el daño por mercurio, empleando como sistema experimental mitocondrias de corteza renal. El DDC presenta un grupo SH en su molécula, confiriéndole gran afinidad por Hg^{2+} , donde la relación estequiométrica DDC:Hg es aproximadamente 2:1, por lo que este compuesto se empleará para quelar al Hg^{2+} y prevenir el daño mitocondrial por dicho metal.

El efecto del fármaco (10 mg/Kg) se evaluó en ratas, a las cuales se les administró por vía i.p., inmediatamente después de administrarse $HgCl_2$ a una concentración de 2 mg/kg vía i.p. Después de 48 h, se encontró que el DDC evitó la pérdida de las actividades mitocondriales inducida por Hg^{2+} en aproximadamente un 89 %.

Se observó además que los grupos SH de la membrana interna mitocondrial están involucrados en la retención de Ca^{2+} , los cuales se afectan considerablemente en la intoxicación con Hg^{2+} .

Experimentos *in vitro* mostraron que el DDC no revierte el daño mitocondrial producido con Hg^{2+} . Se concluye que el DDC previene del daño con Hg^{2+} cuando logra quelar al metal antes que interactúe con las membranas de la célula renal.

El empleo de albúmina sérica de bovino en mitocondrias de ratas tratadas con Hg^{2+} , restablece *in vitro* el transporte de Ca^{2+} y el potencial transmembranal ($\Delta\Psi$). Esto sigiere que la liberación de Ac. grasos vía fosfolipasa A_2 , juega un papel importante en el aumento de la permeabilidad membranal inducida por Hg^{2+} . El restablecimiento del $\Delta\Psi$ es dependiente de Pi, lo que demuestra la existencia de un cotransporte Pi- Ca^{2+} , o bien la intervención de un poro para Ca^{2+} descrito por Crompton (1988).

INTRODUCCION

Una de las características de las células eucariontes, es la presencia de orgánulos; donde se realizan actividades metabólicas especializadas (síntesis de proteínas en retículo endoplásmico rugoso o digestión intracelular en lisosomas por ejemplo). Uno de estos organelos es la mitocondria, donde se transforma la energía de un gradiente electroquímico, en formas utilizables para impulsar las reacciones celulares. La mitocondria presenta dos membranas: una externa y otra interna que tiene más superficie, que se encuentra plegada formando crestas (fig. 1). La membrana interna desempeña dos papeles importantes en la función de la transformación energética. En primer lugar proporciona el armazón para los procesos de transporte de electrones que transforman la energía de las reacciones de oxidación en formas más útiles, especialmente en síntesis de ATP. En segundo lugar, crea un compartimento dentro del organelo, donde están confinadas las enzimas especializadas para catalizar otras reacciones celulares importantes, como el ciclo de Krebs. Este ciclo utiliza algunos compuestos derivados de la oxidación de alimentos, los cuales son ricos en hidrógenos, a los cuales se les extraen sus electrones, mismos que son transferidos a moléculas nucleotídicas como NAD' y FAD. Posteriormente los electrones pasan a lo largo de una cadena de proteínas conocida como cadena de transporte de electrones, ubicada en la membrana interna. En el curso del transporte, los electrones van cayendo sucesivamente a niveles de potencial oxido-reductorio menores. La energía liberada por los electrones en su descenso por la cadena se aprovecha para bombear protones desde la matriz hacia el exterior. El resultado es un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana, y la energía almacenada en este gradiente es a su vez aprovechada, entre otras cosas, por la enzima denominada $H^+ATP_{\text{ sintetasa}}$ para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi (fig. 2). La hipótesis que

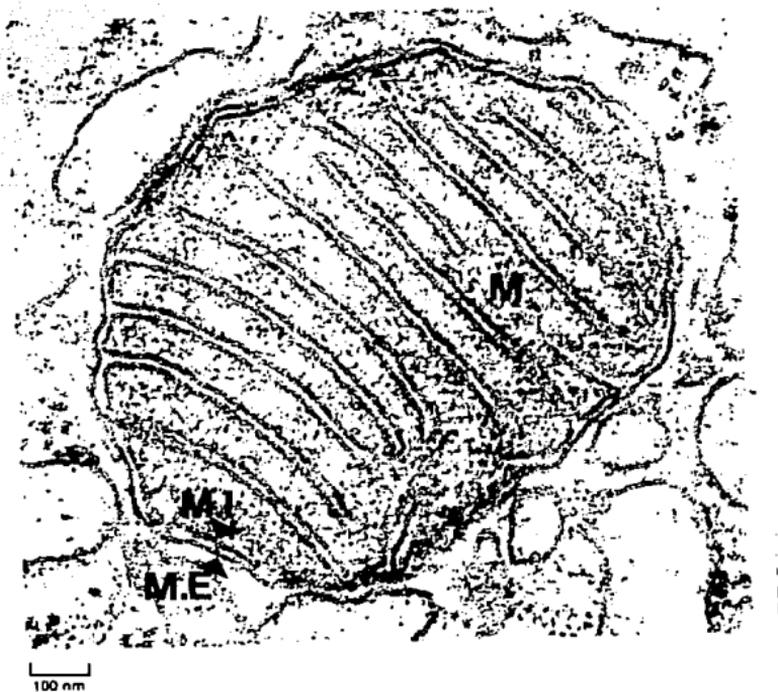


Fig. 1: Microscopía electrónica de un corte mitocondrial, donde se observa claramente la membrana externa (M.E); membrana interna (M.I); y la matriz (M). La M.I. se dobla en múltiples invaginaciones denominadas crestas, aumentando así su superficie; en esta membrana se contienen las enzimas, tanto del transporte de electrones, como el de síntesis de ATP. En la matriz se encuentran la mayoría de las enzimas involucradas en el ciclo de Krebs.

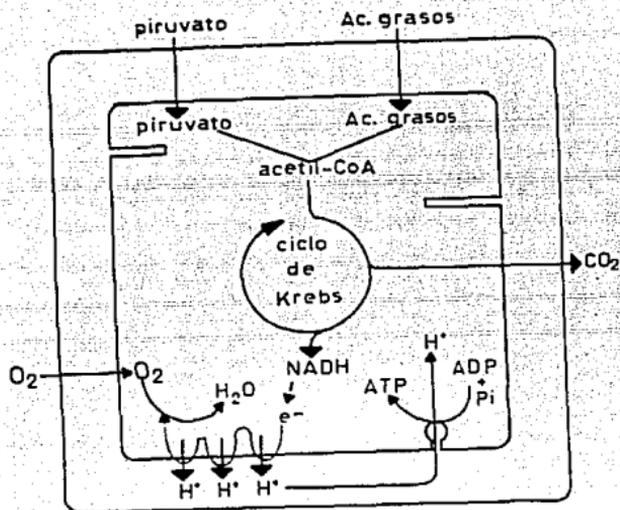


Fig. 2: Representación esquemática de la síntesis de ATP mediante la formación de un gradiente electroquímico. Los electrones con alto potencial oxidoreductor, provenientes de la degradación de la glucosa (glucólisis) o de la degradación de los Ac. grasos (β -oxidación) son transferidos a moléculas de NAD^+ y FAD mediante el ciclo de Krebs. Los nucleótidos de piridina transfieren los electrones a su vez a la cadena respiratoria, lo que induce el bombeo de H^+ y la formación del gradiente electroquímico. Este gradiente se aprovecha entre otras cosas, en la síntesis de ATP.

permite explicar la transducción de energía entre el gradiente electroquímico (denominada fuerza protón-motriz) y la síntesis de ATP, se denomina hipótesis quimiosmótica.

En este trabajo se estudian compuestos que afectan directamente la integridad mitocondrial, es por ello que nos referimos particularmente al metabolismo de este organelo.

La célula depende de la mitocondria para obtener el ATP necesario para llevar a cabo el trabajo constante de biosíntesis, bombeo de iones y solutos, y el movimiento celular que la mantienen viva. Por tanto el mantenimiento de las actividades mitocondriales es de vital importancia para los organismos superiores.

MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Como se ha mencionado, en las membranas biológicas se llevan a cabo procesos esenciales para la célula.

Las membranas biológicas son conjuntos laminares, constituidos principalmente por una matriz lipídica, donde se asocian proteínas transmembranales y periféricas. Las membranas plasmáticas confieren a las células su individualidad al separarlas de su entorno; sin embargo no son simples paredes, sino que constituyen barreras de permeabilidad muy selectivas que contienen sistemas de transporte específicos. Las células eucariontes contienen también membranas intracelulares que delimitan a sus organelos, tales como las mitocondrias. Como veremos más adelante, los sistemas de transporte regulan la composición iónica y molecular del medio.

Debido a la importancia que presentan las membranas en los sistemas biológicos, la biosíntesis de fosfolípidos de membrana, principales moléculas que componen a esta, es trascendental.

El fosfatidato (diacilglicerol-3-fosfato) es un intermediario en la síntesis de fosfolípidos y que, mediante procesos tales como descarboxilaciones y acetilaciones de la serina, el aminoácido que se une al fosfatidato, se forman los principales compuestos que constituyen a la membrana mitocondrial: fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina (fig. 3).

Otro fosfolípido importante en la mitocondria es la cardiolipina, el cual constituye más del 10 % del contenido lipídico de la membrana, y que al parecer contribuye a hacerla más impermeable a los iones (Alberts, 1990).

De esta forma, los fosfolípidos se disponen en una bicapa, donde sus cadenas hidrocarbonadas se dirigen hacia el interior de la membrana y sus cabezas polares hacia el exterior (fig. 4).

La degradación de los fosfolípidos se lleva a cabo principalmente por fosfolipasas específicas, las cuales se clasifican dependiendo de su sitio de acción en: A₁, A₂, C y D (fig.5). Algunas de las fosfolipasas son enzimas digestivas presentes en el jugo intestinal, secreciones bacterianas y venenos (Stryer 1990). También participan en la generación de lípidos que transducen señales. Finalmente, algunas participan en la corrección y recambio de fosfolípidos membranales.

En la mitocondria, por ejemplo, la fosfolipasa A₂ reconoce los fosfolípidos de la membrana interna que se han alterado por peroxidación, degradándolos para después ser reaclados. Como se verá más adelante, la actividad de esta enzima depende de las concentraciones de calcio (Ca²⁺) en el medio, disminuyendo considerablemente la hidrólisis de cualquier fosfolípido en ausencia de este catión (Broekemeier y col. 1985). Por tanto, la modulación de esta enzima ocupa un papel importante en la modificación de la permeabilidad membranar inducida por calcio.

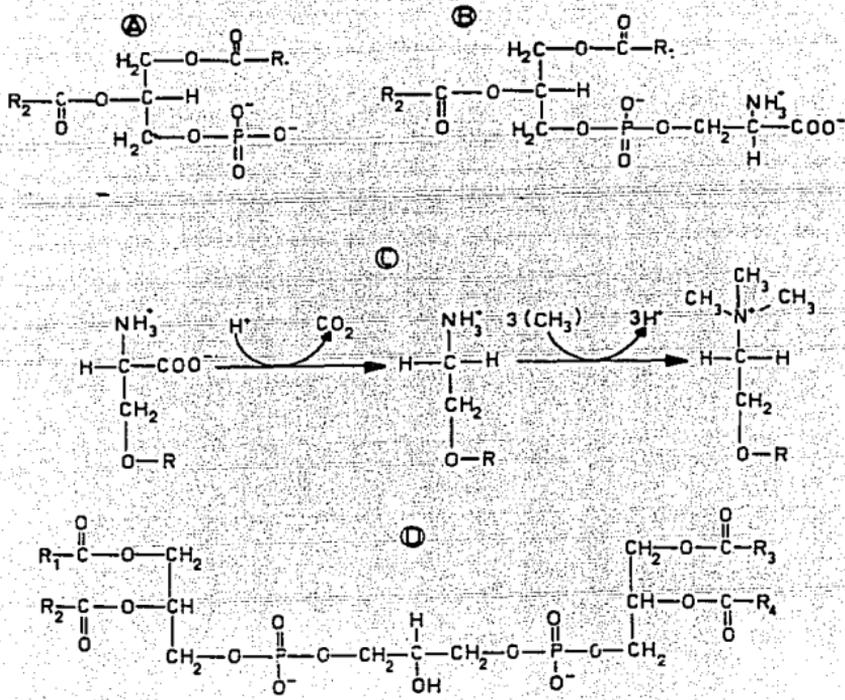


Fig. 3: Fórmulas estructurales de los fosfolípidos que componen las membranas mitocondriales. Fórmula del fosfatidato, principal precursor de fosfolípidos (A). Una vez que la serina se une al fosfatidato, formando fosfatidil serina (B), se desarrolla una vía metabólica para transformar a este fosfolípido en fosfatidil-etanolamina y fosfatidilcolina (C). La cardiolipina es otro compuesto importante de la membrana mitocondrial (D). R₁; R₂; R₃; y R₄ = Cadenas hidrocarbonadas de entre 12 y 24 carbonos. R = Resto de fosfolípido.

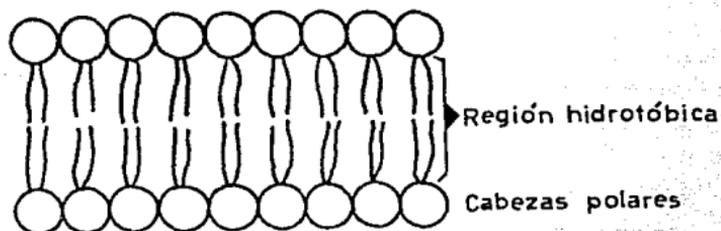


Fig. 4: Representación esquemática de una bicapa lipídica.
La característica anfipática de los fosfolípidos dispone a las cabezas polares hacia el medio acuoso, y las cadenas hidrocarbonadas al espacio intramembranal, donde se forma la región hidrofóbica.

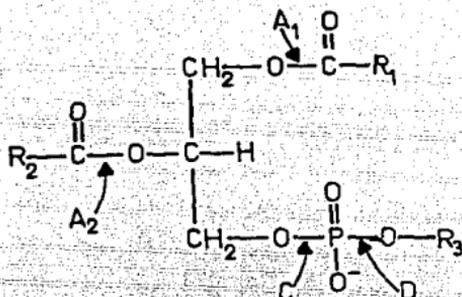


Fig. 5: Especificidad del sitio de hidrólisis de las fosfolipasas. R₁; R₂; R₃ = Cadenas hidrocarbonadas de entre 12 a 24 carbonos.

METABOLISMO DEL CALCIO EN MITOCONDRIA

Entre los elementos que a diferentes niveles figuran en el control de las actividades celulares, el ion calcio (Ca^{2+}) se encuentra involucrado en una serie de reacciones enzimáticas, permitiendo a la célula regular diversos procesos metabólicos y en última instancia, el mantenimiento de la homeostasis. Por ello, el estudio de la regulación, transporte y movilización del Ca^{2+} , así como de los factores que alteran dichos parámetros resulta esencial.

Dentro de la célula, existen varios organelos que emplean en forma importante el calcio, siendo capaces de incorporarlo y retenerlo en cantidades significativamente importantes. Un organelo susceptible de modificar su actividad enzimática por cambios en la concentración libre de calcio en su interior, es la mitocondria, empleándolo para modular la actividad de deshidrogenasas (Crompton, 1988). Se ha demostrado que el Ca^{2+} regula la formación de moléculas con enlaces de alta energía, al modular algunas de las enzimas involucradas en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa (Moreno-Sánchez y col., 1991).

Diversos estados fisiopatológicos y factores extrínsecos pueden alterar los niveles de calcio intracelulares, encontrando una estrecha relación entre un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólica, y el daño mitocondrial, que lleva a la destrucción estructural de este organelo.

A pesar de que la concentración de Ca^{2+} interno mitocondrial depende en buena parte del calcio citoplásmico, la mitocondria contiene un sistema de regulación complicado y específico para este catión (fig. 6). Actualmente, se tienen caracterizados los mecanismos involucrados en regular los movimientos del calcio mitocondrial. Se conoce así que su entrada a la matriz depende del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$), mismo que es formado por oxidación de sustratos o por hidrólisis de ATP (Lehninger y col., 1967). El transporte de Ca^{2+} es mediado por una proteína sensible al colorante de glicoproteínas, rojo de rutenio (Moore, 1971), lantánidos (Reed, 1974)

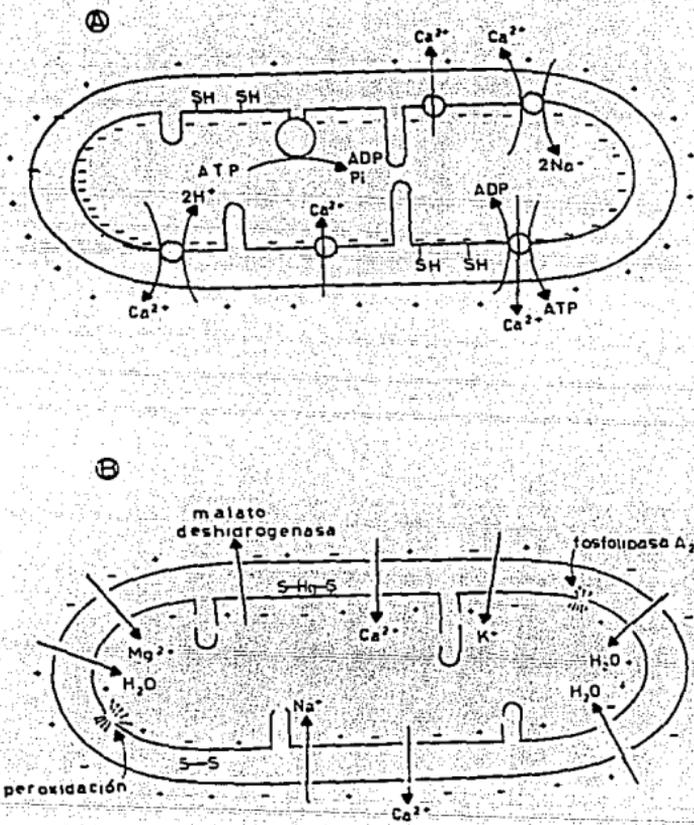


Fig. 6: Representación esquemática de los movimientos iónicos a través de la membrana mitocondrial, mediante transportadores específicos. A: Principales vías de transporte de Ca^{2+} ; la retención de este ion depende del $\Delta\Psi$, mismo que es formado por la cadena respiratoria, o por hidrólisis de ATP. El mantenimiento de la permeabilidad membranal depende en gran medida de los grupos SH libres. B: Estado de alta permeabilidad en el cual iones y moléculas como algunas enzimas, atraviesan por la membrana.

y cadmio (Jarvisalo y col., 1980; Chávez y col., 1985).

Existe un número de mecanismos observados *in vitro* que modulan la retención de Ca^{2+} en mitocondrias. Entre ellos se encuentra: acumulación y mantenimiento de Ca^{2+} en la matriz por efecto del ADP en la estimulación de la enzima deshidrogenasa glutámica (Chávez y col., 1987-a); retención de Ca^{2+} , producido por la unión a cargas negativas internas de la membrana mitocondrial (Carafoli, 1987), donde los sitios de unión para Ca^{2+} son probablemente específicos. Dicha retención se regula a su vez por concentraciones de potasio intramitocondrial (Chávez y col., 1991).

Por otra parte, Crompton y col. (1988), señalan la existencia de un poro en la membrana interna mitocondrial, por donde atraviesan los cationes como el Ca^{2+} , e incluso moléculas de bajo peso molecular como la sacarosa. La apertura del poro depende de la concentración de Ca^{2+} , siendo activado con KH_2PO_4 (P_i). De lo anterior se desprende que la concentración de P_i en el medio puede estar jugando un papel importante en la liberación del calcio mitocondrial, como se demuestra en los resultados del presente estudio.

La salida de calcio es controlada, en el caso de mitocondrias de células cardíacas, por un sistema electroneutro que involucra a una reacción de intercambio $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Crompton y col., 1976). En mitocondrias de hígado de mamífero, la salida se lleva a cabo por un antiportador $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ (Fiskum y col., 1978)

A lo anterior se agrega además, el movimiento de Ca^{2+} por un estado fisiológico alterado, o por factores extrínsecos, apareciendo un estado de permeabilidad inespecífica en la membrana interna de mitocondrias.

Dentro de los estados fisiológicos alterados, se ha encontrado que en cardiopatías donde las arterias coronarias se obstruyen por trombos, y se emplea un agente trombolítico como

tratamiento, la entrada abrupta de sangre a las coronarias suele producir que el corazón presente contracciones asincrónicas. Esto provoca que la sangre no pueda ser bombeada adecuadamente a través del organismo, (Marsh, 1991).

La principal alteración inducida por el evento anteriormente descrito, conocido como arritmias por reperfusión, es la formación de una sobrecarga de Ca^{2+} a nivel celular y mitocondrial. Lo anterior permite el desarrollo de contractura muscular por alteraciones en el acoplamiento excitación-contracción, además de un aumento en la permeabilidad en la membrana interna mitocondrial.

Experimentalmente el aumento de la permeabilidad puede inducirse sobrecargando a las mitocondrias con Ca^{2+} , junto con un agente inductor que, por su parte es muy variado. Los inductores pueden ser compuestos con grupos sulfhidrilos (SH) (Pfeiffer y col., 1978 y 1979), peróxidos (Beatrice y col., 1982; Riley y col., 1985), metabolitos intermediarios (Beatrice y col., 1980; Zoccarato y col., 1982; Bardsley y col., 1982), metales pesados (Chávez y col., 1987-b y 1988), además de otros reactivos (Hertel y col., 1983; Martens y col., 1986).

Bajo esta condición, la mitocondria va perdiendo una serie de funciones primordiales, y se induce una serie de alteraciones ultraestructurales en dicho organelo.

A continuación se mencionan algunos parámetros mitocondriales afectados en el proceso de arritmias por reperfusión, y por la mayoría de los promotores del estado de permeabilidad inespecífico:

- * Pérdida de la capacidad para transportar Ca^{2+} .
- * Incapacidad para retener Ca^{2+} .
- * Abatimiento parcial o total del potencial transmembranal.

- * Incapacidad para formar un gradiente electroquímico, que lleva como consecuencia la disminución parcial o total de la fosforilación oxidativa.
- * Alteración en el estado de reducción de los nucleótidos de piridina.
- * Pérdida de iones y proteínas de bajo y mediano peso.
- * Aumento del volumen mitocondrial.
- * Pérdida de la continuidad de la membrana externa e intramitocondrial y de crestas mitocondriales.

La forma como estas alteraciones aparecen, puede variar con respecto a la magnitud del daño, y del tipo de órgano.

Se ha propuesto que los inductores trabajan bajo un mecanismo común que involucra la perturbación de un ciclo desacilación-reacilación de los fosfolípidos membranales por la modificación en la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de tales fosfolípidos.

De esta manera el calcio incrementa la actividad de la enzima membranal denominada fosfolipasa A_2 , incrementando así la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana, mientras que el agente inductor inhibe (directa o indirectamente) la reacilación de lisofosfolípidos (Broekemeier y col., 1989).

Por otra parte no se han reportado efectos directos de los agentes inductores de la permeabilidad sobre la actividad de la fosfolipasa A_2 . Sin embargo, se han reportado diversos compuestos, principalmente de tipo aromático que actúan como inhibidores de la fosfolipasa A_2 (Broekemeier y col. 1985).

METABOLISMO DEL MERCURIO.

Como se ha mencionado, algunos metales pesados actúan como promotores de la permeabilidad inespecífica (Chávez y col., 1987-b, 1988).

El Hg^{2+} puede inducir, mediante la reacción de Fenton, la formación de radicales $O_2^{\cdot -}$ y OH^{\cdot} , que reaccionan directamente con fosfolípidos membranales, y provocan su degradación oxidativa (fig. 7) (Quinlan y col., 1988). De esta manera, tanto la modificación en la actividad de la enzima fosfolipasa A_2 , como la inducción de la reacción de Fenton promueven la descomposición de algunos fosfolípidos liberándose ácidos grasos. Estos a su vez podrían actuar como detergentes membranales, que al desordenar la estructura de la membrana, contribuirían a formar el estado de alta permeabilidad permitiendo el paso de iones y proteínas a través de la membrana mitocondrial, con sus consecuentes resultados.

Por otra parte, el grupo de Chávez (1989) ha indicado recientemente, que el efecto del ion mercurio en la salida de Ca^{2+} , involucra interacciones del metal con grupos SH de dos diferentes poblaciones de proteínas membranales. Dichas poblaciones se diferencian por pesos moleculares bien definidos, permitiendo inferir la existencia de al menos un camino diferente para la salida de calcio, independiente de la vía de estimulación de la fosfolipasa A_2 . Se ha observado también que el empleo de ditioneitol (DTT), un agente capaz de separar al Hg^{2+} de la membrana, no permite restablecer los procesos metabólicos mitocondriales *in vitro*. Sin embargo, la adición de un agente quelante de Ca^{2+} bajo estas mismas condiciones experimentales, permitió restablecer la actividad mitocondrial (Chávez y col., 1991). Esto significa que si bien se requiere de un inductor para iniciar la salida inespecífica de Ca^{2+} , es este mismo ion el que mantiene su propia salida, aun cuando posteriormente se elimine la unión del inductor con la membrana.



Fig. 7: Reacción tipo Fenton, empleando Hg^{2+} como ion metálico para la catálisis de la reacción. La suma de ambas reacciones produce las especies $\text{O}_2^{\cdot-}$ y OH^{\cdot} .

A pesar de que sólo el 7 % del HgCl_2 que es ingerido por vía oral se absorbe (Mahaffey, 1984), esta sal mercurial es un poderoso tóxico renal el cual actúa principalmente a nivel de las células epiteliales y tubulares, produciendo la muerte de muchas de ellas. Tal necrosis tubular da como resultado una serie de alteraciones fisiológicas, denominadas en conjunto como insuficiencia renal aguda (Guyton, 1991). Entre las consecuencias más importantes de este síndrome se encuentra la retención de Na^+ y agua, con la consecuente aparición de edemas. Al cabo de varios días también puede presentarse hipertensión. En los casos más graves suele aparecer retención de productos nitrogenados e incluso acidosis. Cuando el deterioro renal es muy extenso, y este no es tratado a tiempo, suele producirse la muerte del individuo al cabo de 8 a 14 días.

A nivel celular se ha observado que la mitocondria es el organelo más afectado por el Hg^{2+} (Southard y col., 1974), alterando un conjunto de funciones acopladas entre sí, las cuales han sido mencionadas a lo largo de este trabajo.

Se han descrito algunos focos de contaminación mercurial. En México, el calomel o cloruro mercurioso se utilizó ampliamente como diurético o laxante, y en cremas cutáneas como antiséptico. Actualmente el mercurio inorgánico (como el HgCl_2) se utiliza para elaborar álcalis clorados, plásticos, fungicidas y amalgamas dentales; así como en la extracción de metales, y en la electrónica.

CARACTERISTICAS DEL DIETILDITIOCARBAMATO.

El dietilditio carbamato (DDC) (fig. 8) es el principal metabolito del disulfiram, fármaco empleado en el tratamiento contra el alcoholismo. Este metabolito comenzó a estudiarse desde que se observó su capacidad para quelar los metales de algunas metaloenzimas e inhibir sus actividades (Goodman y col. 1986). Debido a la presencia de un grupo SH en su molécula, el DDC tiene la capacidad de unirse al cobre y otros metales como el Hg^{2+} , por tanto el DDC se puede emplear como quelante de mercurio y prevenir la intoxicación con dicho metal.

CARACTERISTICAS DE LA ALBUMINA SERICA.

Como se mencionó anteriormente, el mercurio promueve indirectamente la liberación de Ac. grasos por medio de dos principales vías: reacción de Fenton y sobreactividad de la enzima fosfolipasa A_2 .

La albúmina sérica es una proteína que juega un papel importante en el metabolismo lipídico (junto con los quilomicrones), pues es un aceptor de ácidos grasos liberados normalmente por las lipasas gastrointestinales en el proceso de digestión (White y col. 1983). De esta forma, la albúmina es una proteína con afinidad para los aniones orgánicos como son Ac. grasos, bilirubina, hormonas tiroideas, y Ac. úrico, los cuales son transportados a través del plasma sanguíneo.

Por tanto, la albúmina sérica de bovino (BSA) podría emplearse como aceptor de Ac. grasos liberados por la intoxicación con Hg^{2+} , evitando su actividad detergente.

Tomando en consideración el grave daño funcional que produce el Hg^{2+} en riñón y en particular en las mitocondrias de este órgano, han sido utilizados diversos fármacos con el fin de revertir el daño por mercurio. En este trabajo aportamos evidencias que señalan al dietilditio carbamato como una droga eficaz en la protección de la nefrotoxicidad por Hg^{2+} .

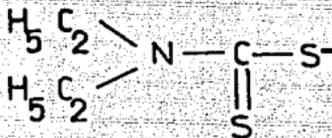


Fig. 8: Fórmula estructural del dietilditiocarbamato (DDC), el compuesto se encuentra ionizado a pH 7.

Asi mismo, las evidencias presentadas en este trabajo, muestran que la BSA es un compuesto capaz de revertir *in vitro* el daño mitocondrial producido por Hg^{2+} .

OBJETIVOS.

Los objetivos planteados para este trabajo son:

1.- Determinar la formación de un complejo DDC:Hg neutralizado mediante la técnica de transferencia de $^{203}\text{Hg}^{2+}$ a una fase orgánica.

2.- Evaluar el efecto del DDC sobre la intoxicación mercurial en la actividad fosforilante acoplada a la respiración mitocondrial, empleando técnicas de respirometría.

3.- a) Determinar el potencial transmembranal mitocondrial en la protección con DDC sobre la intoxicación mercurial, empleando para ello espectrofotometría de doble haz usando el colorante safranina.

b) Así mismo analizar el efecto *in vitro* del BSA sobre el potencial de membrana mitocondrial del grupo intoxicado con Hg^{2+} .

4.- a) Evaluar la variación en la concentración interna de Ca^{2+} mitocondrial, en grupos tratados con Hg^{2+} y DDC + Hg^{2+} , usando espectrofotometría de doble haz y el colorante metalocrómico, arsenazo III.

b) Del mismo modo, evaluar el efecto *in vitro* del BSA sobre el transporte de Ca^{2+} en mitocondrias del grupo tratado con Hg^{2+} .

5.- Cuantificar la retención de Ca^{2+} en mitocondrias del grupo intoxicado con Hg^{2+} , y compararla con el grupo tratado con DDC + Hg^{2+} empleando la técnica de marcaje radioactivo con $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

6.- Determinar la importancia de grupos SH sobre el aumento de la permeabilidad en membrana mitocondrial, en grupos tratados con Hg^{2+} y DDC + Hg^{2+} empleando la técnica espectrofotométrica con DTNB.

MATERIAL Y METODOS.

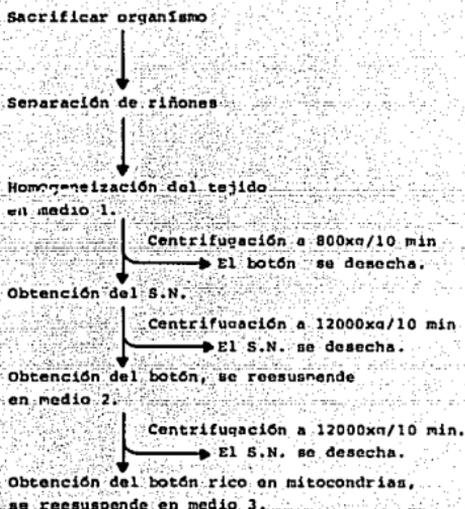
MATERIAL BIOLÓGICO

Ratas Wistar hembras de 300 g fueron intoxicadas i.p. con $HgCl_2$ (2 mg/Kg peso); a las que se inyectó además DDC (10 mg/Kg peso), la vía de administración fue la misma e inmediatamente después de aplicarse el $HgCl_2$. La concentración de Hg^{2+} administrado fue la mitad de la dosis letal media. La concentración de DDC administrado se determinó con una serie de pruebas dosis-respuesta, escogiendo la dosis con mejor resultado. Aproximadamente 48 h después de la administración de los compuestos, las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical.

AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

Las mitocondrias renales se aislaron de la siguiente manera:

1. Los riñones se colocaron en un medio conteniendo sacarosa 250 mM; EDTA 1 mM; TRIZMA 10 mM; pH 7.3; en el transcurso de toda la técnica, el material permanece a 4 °C.
2. El exceso de grasa y la médula renal fueron removidos manualmente.
3. Los riñones se rebanaron en pequeños trozos para ser homogeneizados a razón de un gramo en 10 ml de medio en un homogeneizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem, con pistilo de teflón movido por taladro y regulado con un reostato a 450 rpm. El número de veces que el pistilo entró y salió del homogeneizador fue de 4 a 5 veces; el volumen total homogenado fue de 40 ml.
4. El homogenado se centrifugó a 700xg/10 min para separar células intactas y núcleos de las mitocondrias.
5. El sobrenadante se filtró con gasa, centrifugándose después a 12000xg/10 min; de este



Medio 1.-	Sacarosa	250 mM	Medio 3.-	Sacarosa	250 mM
	EDTA	1 mM		Trizma	10 mM
	Trizma	10 mM		pH	7.3
	pH	7.3			
Medio 2.-	Sacarosa	250 mM			
	BSA	0.1%			
	Trizma	10 mM			
	pH	7.3			

Fig. 9: Diagrama de flujo de la técnica de aislamiento mitocondrial. En el transcurso de la técnica, los medios y el material biológico se mantienen a 4°C.

modo, las mitocondrias se depositan en el fondo del tubo, formando un botón.

6. Posteriormente, el botón fue resuspendido con pincel e incubado por 10 min en sacarosa 250 mM; albúmina (BSA) 0.1 % a pH 7.3 sin EDTA.

7. Al término de la incubación, se llevó a cabo una última centrifugación a 12000xg/10 min, el botón finalmente se resuspendió en aproximadamente 0.5 ml de sacarosa 250 mM pH 7.3.

La fig. 9 muestra un diagrama de flujo para el aislamiento mitocondrial.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA:

La concentración de proteína mitocondrial se determinó con el método de Biuret (Gomall y col. 1949).

El principio del método es el siguiente:



La intensidad del color púrpura es proporcional a la concentración de proteína.

La técnica es la siguiente:

1.- 40 μl de proteína mitocondrial se incubaron durante 15 min en un medio conteniendo NaOH 7%; desoxicolato de sodio 0.005%; CuSO_4 0.07%; volumen final 2.85 ml.

2.- Al término de la incubación, la preparación se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min.

3.- Al sobrenadante se le determinó su absorbencia a 540 nm.

4.- Se realizó una curva patrón de BSA.

5.- Los resultados del sobrenadante se interpolaron con los de la curva patrón, reportándose como mg proteína/ml.

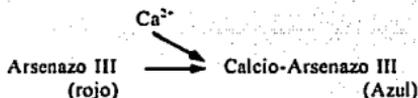
OXIMETRIA.

El consumo de oxígeno se determinó polarográficamente con un electrodo tipo Clark y un oxímetro YSI-5300. Dos mg de proteína mitocondrial se colocaron en un medio conteniendo: sacarosa 250 mM; HEPES 10 mM; fosfato 10 mM, succinato 10 mM; BSA 2.7 mg; rotenona 5 µg; EDTA 476 µM; pH 7.3 , volumen final 2.2 ml con agitación constante, T= 22 °C.

TRANSPORTE DE CALCIO.

El transporte de calcio se determinó usando el indicador metalocrómico Arsenazo III a una concentración de 50 µM (Kendrick, N.C. 1976). El registro se realizó en un espectrofotómetro de doble haz, escogiendo las longitudes de onda 685-675 nm.

El principio de la técnica es el siguiente:



La intensidad del color azul es proporcional a la concentración de calcio.

El medio empleado para la determinación fue el siguiente: sacarosa 250 mM; HEPES 10 mM; Pi 10 mM, succinato 10 mM, BSA 2.7 mg; rotenona 5 µg; ADP 200 µM; y CaCl₂ añadido en la muestra a una concentración de 50 µM . pH 7.3; en un volumen final de 3 ml con agitación y oxigenación constante; T= 22°C.

POTENCIAL TRANSMEMBRANAL

El potencial transmembranal se evaluó con espectroscopía de doble haz, escogiendo las longitudes de onda a 533-511 nm, empleando el colorante safranina (15 μ M) (Akerman y Wiktröm, 1976).

El principio de la técnica es el siguiente:

Safranina en espacio extramitocondrial \longrightarrow Safranina en espacio mitocondrial, más negativo, la safranina vira a rosa.

La safranina es un compuesto lipofílico que atravieza la membrana mitocondrial, depositandose en la superficie de la cara interna de la membrana interna mitocondrial. Mientras más cargas negativas existan en la matriz mitocondrial, mayor será la intensidad del color rosa. La intensidad es proporcional a la diferencia de $\Delta\Psi$.

Las mitocondrias se añadieron en un medio conteniendo: sacarosa 250 mM; HEPES 10 mM; Pi 10 mM, succinato 10 mM; BSA 2.7 mg; rotenona 5 μ g; ADP 200 μ M; pH 7.3; el volumen final fue 3 ml con agitación y oxigenación constante; T= 22°C.

DETERMINACION DE GRUPOS SH LIBRES.

Los grupos tiol libres de la membrana se determinaron espectrofotométricamente, empleando el colorante DTNB (65 μ M) (Ellman, 1959). El principio de la técnica es el siguiente:



La intensidad del amarillo es proporcional al número de SH libres.

Los pasos de la técnica fueron los siguientes:

1. Dos mg de proteína mitocondrial fueron incubados durante 20 min en un medio conteniendo: sacarosa 250 mM; HEPES 10 mM; Pi 10 mM; succinato 10 mM; ADP 200 μ M.

2. Al término de la incubación, la preparación se centrifugó a 12000xg/10 min.
3. Al sobrenadante se le determinó su absorbencia a 412 nm.
4. Se hizo una curva patrón con cisteína de la siguiente forma: se preparó una solución fresca de cisteína, para tomar de esta 10, 20, 40, y 80 nmol y añadirlos en un medio conteniendo HEPES 10 mM; DTNB 65 μ M; pH 7.3. En cada adición de cisteína se determinó la absorbencia a 412 nm Vs nmol de cisteína.
5. Los resultados del sobrenadante mitocondrial se correlacionaron con los de la curva patrón de cisteína.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CALCIO TOTAL

Esta determinación se refiere a la concentración de calcio presente en la matriz, acumulada durante las 48 h después de intoxicar a los organismos. La determinación se realizó de la siguiente manera:

1. Dos mg de proteína mitocondrial, la cual se congeló previamente 48 h para permitir la salida del contenido de la matriz, se añadieron a 3 ml de un medio con HEPES 10 mM; arsenazo III 150 μ M; pH 7.3.
2. La preparación fue leída a doble longitud de onda, escogiendo las longitudes 685-675 bajo agitación constante; T= 22°C.
3. Se elaboró una curva patrón de Ca^{2+} de la siguiente forma: en un medio conteniendo arsenazo III 150 μ M ; HEPES 10 mM; pH 7.3, se añadió consecutivamente 6, 12, 24, 48 y 120 nmol de Ca^{2+} , determinandose la absorbencia Vs nmol de Ca^{2+} .
4. Los resultados de la preparación mitocondrial se interpolaron con los de la curva patrón.

TRANSFERENCIA DE $^{203}\text{Hg}^{2+}$ POR EL DDC A UNA FASE ORGANICA (BUTANOL-TOLUENO).

La transferencia de $^{203}\text{Hg}^{2+}$ se realizó de la siguiente forma:

- 1.- Se hizo una fase orgánica conteniendo 1-butanol 45% - tolueno 55% (V/V).
- 2.- La fase no orgánica se compuso de Pi 10 mM pH 7.3.
- 3.- Se añadió 1 ml de cada fase en un tubo de ensaye.
- 4.- En la fase no orgánica se adicionó $^{203}\text{Hg}^{2+}$ (activ. especif. 10000 cpm/nmol) para obtener una concentración de 30 μM .
- 5.- La preparación se agitó durante 1 min.
- 6.- Al término de esto, se tomó de la fase orgánica una alicuota de 50 μl , colocandose en un vial de 20 ml.
- 7.- Al vial se le agregó 5 ml de líquido de centelleo.
- 8.- En otro tubo se realizó el mismo procedimiento, añadiendo además DDC para obtener una concentración de 45 μM en la fase inorgánica.
- 9.- Las cpm se estimaron en un contador de centelleo líquido (BECKMAN LS 7800).

DETERMINACION DE LA UNION DE $^{203}\text{Hg}^{2+}$ EN MITOCONDRIAS.

La unión de $^{203}\text{Hg}^{2+}$ se determinó en mitocondrias de ratas, intoxicadas 48 h previas a su sacrificio, con $^{203}\text{HgCl}_2$ (2 mg/Kg peso, actividad específica 500 cpm/nmol) via i.p. de la siguiente forma:

1. En un sistema de filtración conectado a una bomba de vacío, 0.2 mg de proteína mitocondrial se depositaron en filtros MILLIPORE (diámetro del poro 0.45 μm) previamente humedecidos con aprox. 10 ml de H_2O tridestilada.

2. Inmediatamente después, los filtros se lavaron con 5 ml de KCl 0.1 M, con el fin de eliminar el $^{203}\text{Hg}^{2+}$ adherido inespecíficamente en la superficie de las mitocondrias.

3. Los filtros se colocaron en viales de 20 ml y se secaron para eliminar el exceso de humedad.

4. A los viales se les agregó 5 ml de líquido de centelleo.

5. Las cpm se estimaron en un contador de centelleo líquido.

RETENCION DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$:

La retención de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ se determinó de la siguiente manera:

1.- Dos mg de proteína mitocondrial se incuban durante 3 min en un medio conteniendo: sacarosa 250 mM; Pi 10 mM; succinato 10 mM; rotenona 5 μg ; ADP 200 μM ; $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (actividad específica: 900 cpm/nmol); HEPES 10 mM; pH 7.3. El volumen final es de 3 ml con agitación y oxigenación constante; T= 22°C.

2.- Al término del tiempo de incubación, 0.2 mg de proteína mitocondrial se depositan en filtros MILLIPORE, los filtros se procesan en la misma forma que en la técnica para determinar la unión de $^{203}\text{Hg}^{2+}$.

Otras adiciones se reportan individualmente en cada experimento.

RESULTADOS.

DETERMINACION DEL COMPLEJO Hg:DDC

El dietilditiocarbamato (DDC), es un compuesto que posee un grupo sulfhidrilo (SH), ionizado a pH fisiológico. Este compuesto presenta afinidad por iones Hg^{2+} ($K = 204.17 \pm 4.41$) (Gunnar y Martell, 1971), donde la relación DDC: Hg^{2+} es aproximadamente 2:1 (fig. 10).

La capacidad del DDC para unir Hg^{2+} de un experimento representativo se muestra en la tabla 1. 45 nmol de DDC fueron capaces de transferir 20.6 nmol de Hg^{2+} a una fase orgánica formada por butanol-tolueno, es decir, una relación DDC:Hg aparente de 2:1. Es importante destacar que en ausencia de DDC solamente 0.32 nmol de Hg^{2+} se encuentran presentes en el medio hidrofóbico. Esto se debe a la escasa propiedad del Hg^{2+} de solubilizarse en medios no polares.

EFEECTO in vivo DEL DDC SOBRE LA INTOXICACION RENAL PRODUCIDA POR MERCURIO.

El análisis de 5 experimentos sobre la actividad respiratoria en mitocondrias de ratas tratadas con mercurio, muestra que el metal inhibe la fosforilación oxidativa (fig. 11, trazo A). De esta manera, la velocidad del consumo de oxígeno en el estado 3 y 4 es la misma (33.6 nAO/2mg· min)

Sin embargo, en las mitocondrias renales de ratas inyectadas con Hg^{2+} + DDC, el valor del consumo de oxígeno estimulado por ADP (edo 3= 344 nAO/2mg· min), es superior al valor del consumo de oxígeno en ausencia de ADP (edo 4 = 88 nAO/2mg· min), presentando un

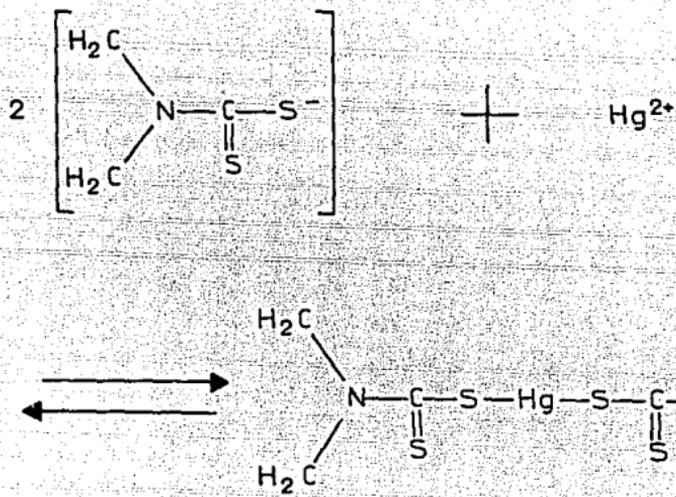


Fig. 10: Reacción química entre el DDC y el Hg^{2+} , donde la unión es entre el grupo tiol ionizado y el catión Hg^{2+} . La estequiometría DDC:Hg es aproximadamente de 2:1.

nmol de Hg ²⁺ en fase orgánica	
Hg ²⁺ (30 nmol)	0.32
Hg ²⁺ + DDC (45 nmol)	20.60

Tabla 1: Transferencia de Hg²⁺ hacia una fase orgánica (butanol-tolueno) por el DDC. Las condiciones experimentales se describen en material y metodo.

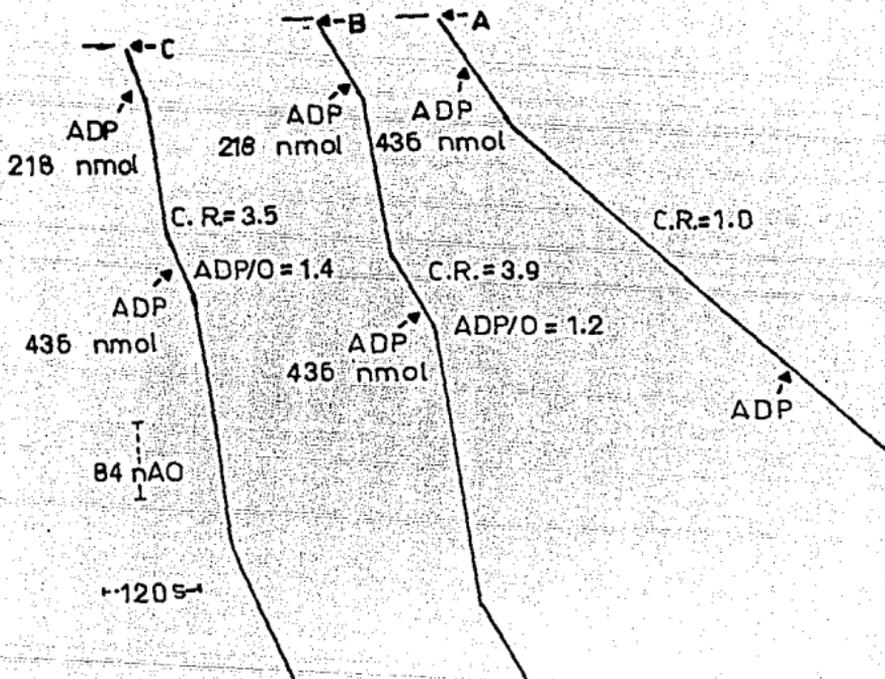


Fig. 11: Efecto del DDC sobre la intoxicación mercurial en la actividad respiratoria. Dos mg de proteína mitocondrial se agregaron a un medio descrito en material y metodos. A= grupo tratado con Hg^{2+} ; B= grupo tratado con Hg^{2+} + DDC; C= grupo control.

C.R = 3.9 y una relación ADP/O = 1.2 (fig. 11, Trazo B). Estos valores son similares a los observados en mitocondrias control (fig. 11, Trazo C). La aparente disminución en la velocidad del consumo de O_2 en el grupo tratado con Hg^{2+} , podría deberse al efecto artefactual del aumento en el volumen del medio de reacción, por la adición del nucleótido (10 μ l); o bien al agotamiento de los sustratos endógenos, que permitan estimular la velocidad del consumo de O_2 al inicio del trazo.

Al determinarse el potencial de membrana en las mitocondrias renales de ratas inyectadas con mercurio, se observa que la intoxicación con este metal abate la formación del potencial transmembranal ($\Delta\psi$) (fig. 12, Trazo A). En cambio, el grupo tratado con Hg^{2+} + DDC mantiene la capacidad de formar $\Delta\psi$, incluso después de haberse añadido 50 μ M de Ca^{2+} (fig. 12, Trazo B). Estos resultados son similares a lo observado en el grupo control (fig. 12, Trazo C).

Por otra parte, Chávez y col.(1988,1990) demostraron que el ion Hg^{2+} promueve un aumento de permeabilidad, dando como consecuencia, la pérdida de las funciones de transporte y retención de calcio. La figura 13 muestra que al igual que en dichos reportes, no se presenta transporte de calcio en mitocondrias renales aisladas de ratas tratadas con mercurio, mostrando incluso la salida progresiva del catión de la mitocondria (fig. 13, Trazo A).

Sin embargo, las mitocondrias renales de ratas inyectadas con DDC + Hg^{2+} transportaron Ca^{2+} (fig. 13, Trazo B), de modo muy similar al grupo control (fig. 13, Trazo C).

La tabla 2 muestra el análisis cuantitativo de la acumulación de Ca^{2+} medido por radioactividad, retenido *in vitro*, confirmando que la administración de DDC previene el efecto del Hg^{2+} . Después de 3 min de incubación con $^{45}Ca^{2+}$, las mitocondrias renales de ratas inyectadas con mercurio sólo captan 1.55 ± 0.3 nmol Ca^{2+} /mg, mientras que el grupo tratado con Hg^{2+} + DDC retiene 54.2 ± 0.4 nmol Ca^{2+} /mg. Este valor se aproxima más al observado en el grupo control

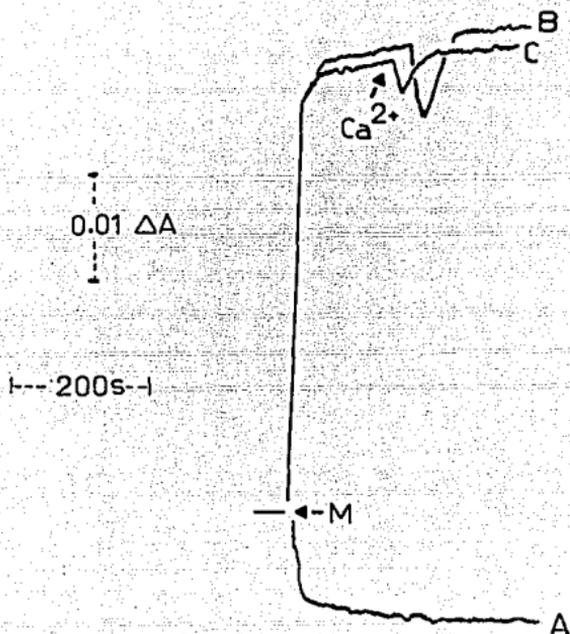


Fig. 12: Formación del potencial transmembranal; se añadieron 2 mg de proteína mitocondrial en un medio descrito en material y metodos. A= grupo tratado con Hg^{2+} ; B= grupo tratado con DDC + Hg^{2+} ; C= grupo control; M= adición de mitocondrias.

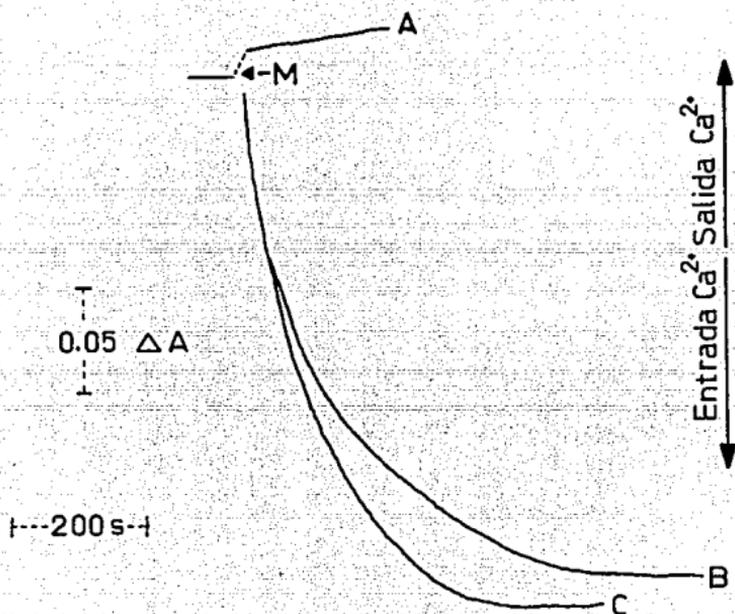


Fig. 13: Efecto del DDC sobre la intoxicación por Hg^{2+} en el transporte de Ca^{2+} . Las condiciones experimentales se describen en material y metodos.

A= grupo tratado con Hg^{2+} ; B= grupo tratado con DDC + Hg^{2+} ; C= grupo control; M= adición de mitocon_drias.

	$^{45}\text{Ca}^{2+}$ unido (nmol/mg)
CONTROL	57.6 ± 1.65
DDC + Hg^{2+}	54.2 ± 0.4
Hg^{2+}	1.55 ± 0.3

Tabla 2: Retención mitocondrial de Ca^{2+} . Dos mg de proteína mitocondrial se incubaron bajo la técnica experimental descrita en material y métodos. Los valores son el promedio de 3 experimentos.

(57.6 ± 1.65 nmol Ca^{2+} /mg).

Por otra parte, la determinación de calcio total mitocondrial acumulado *in vivo* (TABLA 3), reveló que la administración de mercurio provoca sobreacumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, incrementándose 12 veces más la concentración de este catión (263.78 nmol/mg) con respecto al valor obtenido en el grupo control (21.12 nmol/mg). Sin embargo, en el grupo inyectado con Hg^{2+} + DDC, la concentración de calcio mitocondrial fue de 23.71 nmol/mg, dando un valor muy similar al del grupo control (21.12 nmol/mg). Estos resultados sugieren que bajo las condiciones que prevalecen en un organismo completo, el Hg^{2+} promueve el desplazamiento del Ca^{2+} hacia el interior de la mitocondria, aumentando así la concentración de Ca^{2+} en el organelo.

Con respecto al sitio de unión de Hg^{2+} sobre la mitocondria, Chávez y Holguín (1988) demostraron que el Hg^{2+} se une principalmente en grupos SH membranales. Esto promueve el aumento de la permeabilidad mitocondrial al calcio. Dada la importancia, se decidió cuantificar la concentración de grupos SH en nuestras tres poblaciones mitocondriales (TABLA 4). Los resultados muestran que la intoxicación con Hg^{2+} disminuye en forma significativa los grupos SH libres de las mitocondrias renales (14 ± 2.94 nmol SH/mg), a la mitad del valor control (26.5 ± 0.48 nmol SH/mg), debido a la fuerte unión con el mercurio. En contraste cuando el Hg^{2+} se administra junto con el DDC, el número de grupos SH libres aumenta a 23.4 ± 1.81 nmol SH/mg, dando un valor similar al grupo control (26.5 ± 0.48 nmol SH/mg). Esto fue interpretado como que el fármaco evita considerablemente la unión del mercurio con los grupos SH.

Chávez y Holguín (1988) demostraron que se produce un incremento en la permeabilidad inespecífica al Ca^{2+} cuando se da la unión de 2 nmol de Hg^{2+} por mg de proteína. Considerando lo anterior, procedimos a determinar la concentración de Hg^{2+} unido en mitocondrias renales de

	Ca ²⁺ total nmol/mg
CONTROL	21.12
DDC + Hg ²⁺	23.71
Hg ²⁺	263.78

Tabla 3: Determinación del Ca²⁺ total mitocondrial.

Los valores pertenecen a un experimento representativo donde dos mg de proteína mitocondrial (previamente congelada durante 48 h) se añadieron en un medio descrito en material y métodos.

	nmol de grupos SH/mg
CONTROL	26.5 ± 0.48
DDC + Hg ²⁺	23.4 ± 1.81
Hg ²⁺	14.0 ± 2.94

Tabla 4: Determinación de grupos tiol (SH) membranales; los detalles experimentales se describen en material y metodos. Los valores son el resultado del promedio de 4 experimentos.

ratas tratadas con $^{203}\text{Hg}^{2+}$ y $^{203}\text{Hg}^{2+}$ + DDC. La administración de $^{203}\text{Hg}^{2+}$ *in vivo* revela que la población inyectada sólo con mercurio contiene 1.9 nmol Hg^{2+} /mg, valor que se aproxima a lo reportado anteriormente por Chávez y col.(1990). Este valor disminuye a 1.2 nmol Hg^{2+} /mg cuando se administra DDC junto con el Hg^{2+} .

ESTUDIO in vitro DEL DDC SOBRE EL EFECTO TOXICO MERCURIAL

Para determinar la posibilidad de que el efecto protector del DDC sobre la intoxicación fuera mediante la remoción del mercurio de la membrana mitocondrial, se decidió estudiar el efecto *in vitro* del fármaco sobre la liberación del Ca^{2+} y el abatimiento del $\Delta\psi$ inducido por Hg^{2+} . La figura 14 muestra que la adición de 10 μM de Hg^{2+} , en mitocondrias con Ca^{2+} acumulado durante la oxidación de succinato, induce la salida masiva de calcio.

Esto es consistente con los reportes de Chávez y Holguín (1988) y Chávez y col. (1989). La presencia de 15 a 50 μM de DDC en la preparación, no evita la salida masiva del catión inducida por mercurio. A mayores concentraciones de DDC, el compuesto induce por si solo la salida de calcio mitocondrial. Esto último podría deberse a que el DDC interactúa con los SH membranales, disminuyendo su número de grupos reducidos, aumentando así la permeabilidad.

El mismo fenómeno ocurre, cuando se determina el efecto del DDC en la formación del en presencia de Hg^{2+} . Como en previos reportes (Chávez y Holguín, 1988; Chávez y col., 1990), el ion Hg^{2+} (10 μM) abate el potencial transmembranal de mitocondrias con Ca^{2+} almacenado, donde la adición de 15 μM de DDC no logra mantener el estado energético de la membrana mitocondrial (fig. 15).

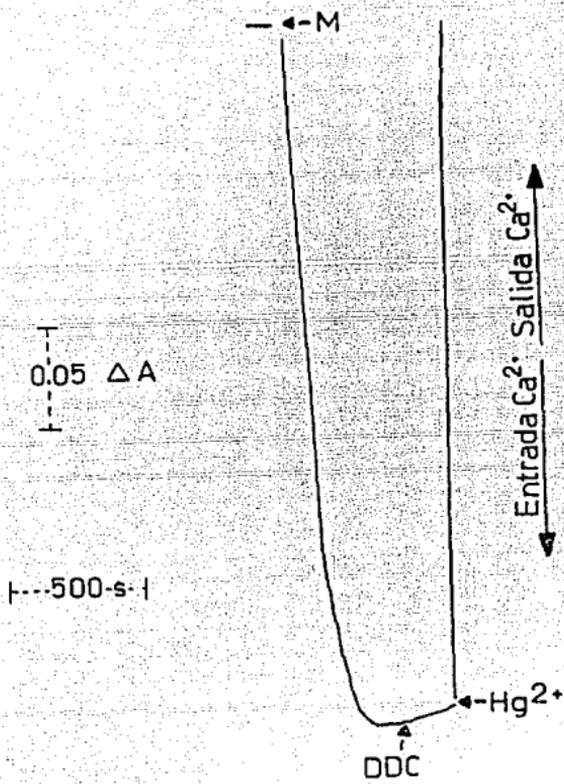


Fig. 14: Liberación del Ca^{2+} mitocondrial inducida por Hg^{2+} . Dos mg de proteína mitocondrial fueron incubados en un medio descrito en material y métodos. Cuando se indica, se añadió DDC $15 \mu\text{M}$, o bien Hg^{2+} $10 \mu\text{M}$. M = adición de mitocondrias.

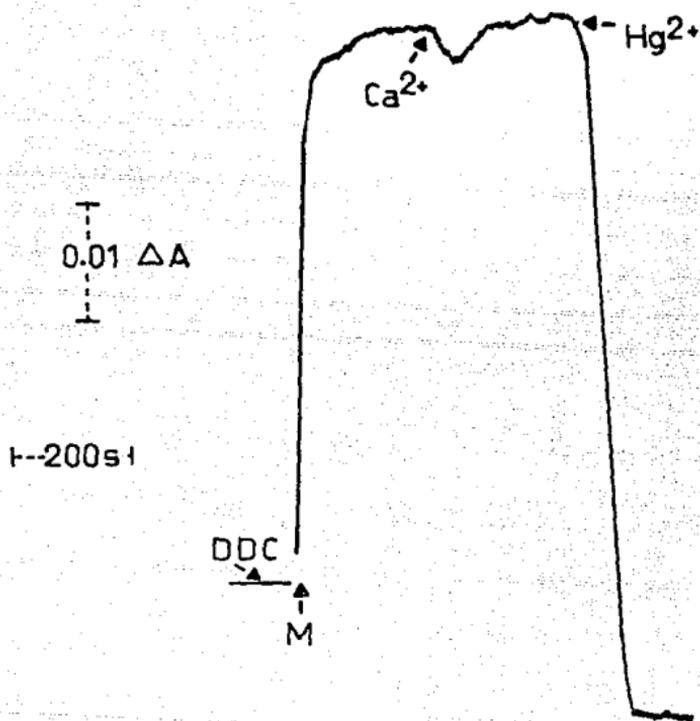


Fig. 15: Abatimiento del $\Delta\psi$ inducido por Hg^{2+} . Dos mg de proteína mitocondrial fueron incubados en un medio descrito en material y metodos. Cuando se indica, se añadió DDC 15 μM , o bien Hg^{2+} 10 μM . M= adición de mitocondrias.

ESTUDIO *in vitro* DE LA BSA SOBRE EL EFECTO TOXICO MERCURIAL.

Como se mencionó, el Hg^{2+} promueve la liberación de Ac. grasos membranales. La albúmina sérica de bovino (BSA) presenta gran afinidad por estos ácidos, propiedad que puede emplearse para evitar su efecto detergente. Por esta razón, se determinó el efecto protector del BSA (1.3 mg BSA/mg proteína) en mitocondrias renales aisladas de ratas intoxicadas con Hg^{2+} .

El análisis del estado energético, mostró que el BSA restituye pobremente al $\Delta\psi$ cuando se añade Pi a una concentración de 10 mM en el medio de incubación. El $\Delta\psi$ se abate totalmente cuando se agrega al medio 50 μM de Ca^{2+} (fig. 16, Trazo A). En cambio el trazo B señala que la formación del $\Delta\psi$ se restableció luego de añadirse BSA a un medio ausente de Pi, en esta condición, el potencial transmembranal permanece en valores altos aún después de haberse agregado Ca^{2+} (fig. 16, Trazo B). El mismo efecto se encontró en el transporte mitocondrial de Ca^{2+} . En un medio conteniendo 10 mM de Pi, la adición de BSA sólo evita la salida progresiva del Ca^{2+} mitocondrial, sin llegar a restablecer el transporte (fig. 17, Trazo A). En contraste, cuando no se añade Pi al medio, el BSA restaura la capacidad de transportar calcio (fig. 17, Trazo B).

Debido a que la BSA presenta en su estructura varios grupos SH, fue necesario demostrar que el efecto protector se explica por la interacción de la BSA, con los Ac. grasos liberados, y no por un efecto quelante entre los grupos SH de la BSA y los iones Hg^{2+} , separando así al metal de los SH membranales de la mitocondria. La figura 18 muestra la salida de Ca^{2+} producida por la adición de 10 μM de Hg^{2+} a mitocondrias previamente cargadas con Ca^{2+} por la oxidación de succinato. La adición de 2.6 mg de BSA no evitó la salida masiva de Ca^{2+} .

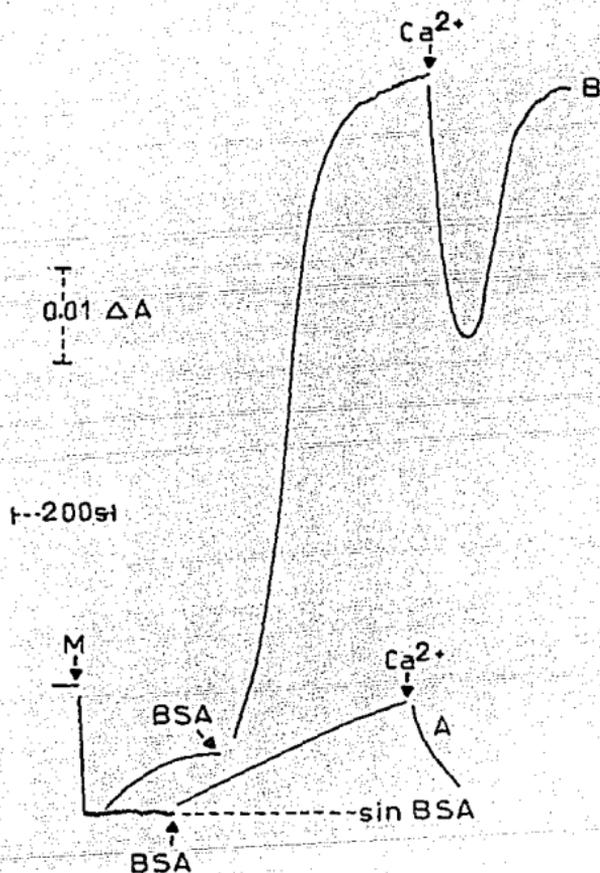


Fig. 16: Efecto de la BSA sobre el potencial transmembranal. En un medio descrito en material y métodos, se añadieron 2 mg de proteína mitocondrial obtenida del grupo tratado con Hg^{2+} . Cuando se señala, se añadió 2.6 mg de BSA. A = medio con Pi 10 mM; B = medio sin Pi ; M = adición de mitocondrias.

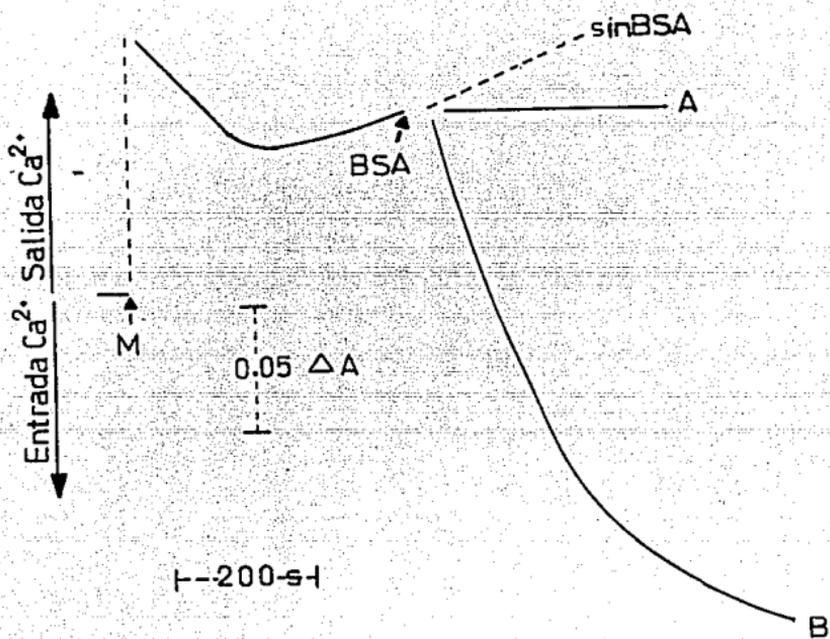


Fig. 17: Efecto de la BSA sobre el transporte de Ca^{2+} . En un medio descrito en material y métodos, se añadieron 2 mg de proteína mitocondrial obtenida del grupo tratado con Hg^{2+} . Cuando se señala, se añadió 2.6 mg de BSA. A = medio con Pi 10 mM; B = medio sin Pi ; M = adición de mitocondrias.

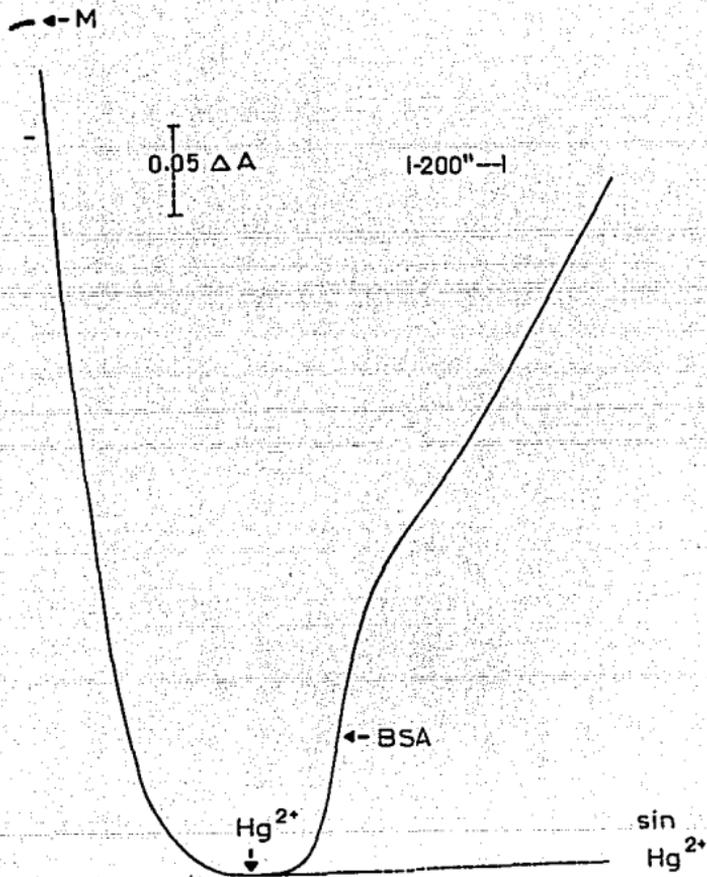


Fig. 18: Efecto de la BSA sobre la salida de Ca^{2+} inducida *in vitro* por Hg^{2+} . Dos mg de proteína mitocondrial del grupo control se añadieron a un medio descrito en material y métodos; cuando se señala, se añadió Hg^{2+} para obtener una concentración final de $10 \mu\text{M}$, o bien se agregó 2.6 mg de BSA. Volumen final, 3 ml. M = adición de mitocondrias.

DISCUSION.

Estudios realizados sobre el tratamiento de la intoxicación por mercurio, involucran fármacos que contienen en su estructura molecular, grupos SH comprometidos directamente en su actividad terapéutica (Ambudkar y col., 1983; Chávez y col., 1990). El presente trabajo demuestra que el producto de la degradación metabólica del disulfiram, DDC, protege del daño producido por mercurio *in vivo*, cuando se administra inmediatamente después del Hg^{2+} .

Experimentos *in vitro* demuestran, no obstante, que el DDC no previene el efecto tóxico del mercurio sobre la fosforilación oxidativa, el estado energético, o el control en la permeabilidad al Ca^{2+} mitocondrial. Al respecto, cabe destacar las diferencias en afinidad; mientras la afinidad del mercurio por los grupos SH membranales es de 1.5×10^8 (Chávez y Holguín, 1988), la afinidad del DDC por Hg^{2+} es de 2×10^2 (Gunnar y Martell, 1971). Esto significa que, en presencia de ambos sustratos (DDC y grupos SH membranales) el Hg^{2+} reaccionará preferencialmente con los SH membranales, siendo muy baja la afinidad del DDC como para desplazar al mercurio una vez unido a la membrana.

Los experimentos *in vivo* muestran que el DDC protege parcialmente del daño producido por Hg^{2+} , encontrándose que la concentración de mercurio unido en mitocondrias aisladas de ratas tratadas sólo con Hg^{2+} (1.9 nmol/mg) disminuye en el grupo tratado con $Hg^{2+} + DDC$ (1.2 nmol/mg), que indican que, para que el DDC ejerza su efecto protector, el Hg^{2+} debe unirse al fármaco antes que el metal interactúe con la membrana interna mitocondrial de la célula renal.

Una observación interesante aparece al comparar la cantidad de Hg^{2+} unido *in vivo*, con el valor de grupos SH membranales modificados por envenenamiento con dicho metal. Suponiendo que el sitio de unión del mercurio en la membrana mitocondrial fuera exclusivamente

en los grupos SH, en relación 1:2; el número de tioles modificados por la intoxicación (12.5 nmol/mg) es aún muy superior al número teórico de SH ocupados por Hg^{2+} (3.8 nmol/mg). Esta aparente discrepancia puede explicarse, al tomar en cuenta la relación existente entre el control del estado de reducción de los grupos SH, envueltos en la salida de Ca^{2+} ; y la disminución de nucleótidos de piridina reducidos, que acompaña al aumento en la permeabilidad a calcio (Bellomo y col., 1982; Chávez y Jay, 1987; Chávez y Holguin, 1988; Chávez y col., 1990). El NAD(P)H se emplea como sustrato en sistemas (p.e. glutatión reductasa) que restauran las formas sulfhidrilo activas de enzimas; la oxidación de esta coenzima se incrementa enormemente cuando aumenta la permeabilidad a Ca^{2+} por un inductor. De esta manera, la disminución en la relación NAD(P)H/NAD(P)⁺, modificará a largo plazo, un gran número de grupos tior, amplificando el valor de SH oxidados en la intoxicación por mercurio.

Otro punto interesante a notar, es la relación en las concentraciones de Ca^{2+} intramitocondrial inducidas por Hg^{2+} , entre experimentos *in vitro* e *in vivo*. Los primeros confirman que el Hg^{2+} induce la salida masiva de Ca^{2+} al alterar la permeabilidad membranal. Los resultados *in vivo*, sugieren que el movimiento de calcio inducido por mercurio depende de las concentraciones parciales de Ca^{2+} presentes en el medio extramitocondrial, desplazandose a favor de su gradiente químico. De acuerdo con lo anterior, el aumento en la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial *in vivo*, se explicaría al suponer que el Hg^{2+} aumenta también la permeabilidad del Ca^{2+} en la membrana celular mediante la peroxidación de fosfolípidos, (ver antecedentes). Esto permitiría la entrada de calcio, debido a que la concentración de este último en la célula, es 3 o 4 órdenes de magnitud menor (entre 0.1 y 10 μ M) que en el medio extracelular (3 mM). Por otra parte, la concentración de Hg^{2+} también puede alterar el Ca^{2+} celular, al perturbar grupos SH, localizados tanto en la membrana citoplásmica (Mannervick y col., 1981), como en la

membrana del retículo endoplásmico (Moore y col., 1975) que también están involucrados en el mantenimiento de la concentración y retención de Ca^{2+} intracelular.

La peroxidación de fosfolípidos con la subsecuente liberación de Ac. grasos inducida por Hg^{2+} , ha sido reportada (Benov y col., 1990). Suponiendo que la actividad detergente de los Ac. grasos constituye un elemento importante en el incremento de la permeabilidad inespecífica de la membrana, el restablecimiento *in vitro* del $\Delta\Psi$ y del transporte de Ca^{2+} por BSA se explica, en buena parte a la retención de los Ac. grasos con BSA, evitando así su actividad detergente. Así mismo, la regeneración de las actividades mitocondriales en ausencia y presencia de Pi en el medio, puede estar implicando la participación de un poro en la membrana interna mitocondrial, dependiente de Ca^{2+} y activado por Pi (Crompton y col., 1988). De este modo, cuando en el medio se encuentran las condiciones para abrir el poro, esto es, una concentración de Ca^{2+} por arriba de 25 nmol/mg, y una concentración de Pi de alrededor de 5 mM; aparece una extensa salida de Ca^{2+} que abate el $\Delta\Psi$ y el transporte de calcio. Al disminuir la concentración de Pi en el medio, se induce el cierre del poro, y se evita la salida de Ca^{2+} por este sitio, lo cual ayuda a restablecer la retención de este catión. Por tanto, la restitución con BSA del $\Delta\Psi$ y transporte de calcio se ve favorecida en un medio donde no se añade fosfato.

Por otra parte, Gunter y col. (1990), ha indicado que la salida de Ca^{2+} mitocondrial también puede ser mediada por el cotransporte con determinados iones, entre los cuales, el H_2PO_4^- o HPO_4^{2-} es uno de ellos. De esta manera, una concentración elevada de Pi provocaría un importante cotransporte de $\text{Ca}^{2+} + \text{Pi}$ a través de la membrana, aumentando considerablemente su permeabilidad. Por tanto, puede esperarse el efecto contrario cuando la concentración de Pi en el medio sea pequeña, amplificando así el efecto protector del BSA.

CONCLUSIONES

- 1.- La intoxicación con HgCl_2 induce en las mitocondrias de células renales, un aumento de la permeabilidad al calcio; dando como resultado la pérdida de la actividad fosforilante, y del estado energético.
- 2.- La disminución del número de grupos SH libres membranales está íntimamente ligado al aumento en la permeabilidad al Ca^{2+} .
- 3.- Debido a la diferencia de afinidades entre el DDC y los grupos SH membranales por el Hg^{2+} , se especula que el DDC protege cuando logra quelar al metal antes que este último interacción con la célula renal.
- 4.- La albúmina restablece *in vitro* el transporte de Ca^{2+} y el estado energético mitocondrial, pero requiere de concentraciones bajas de Pi. Esto último sugiere la existencia de un poro inactivado por bajos niveles de Pi, o bien la disminución de un cotransporte $\text{Ca}^{2+} + \text{Pi}$. De esta forma aumenta la impermeabilidad de la membrana.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos con el DDC, en la protección contra la intoxicación mercurial, se abre una propuesta con respecto a su posible aplicación clínica.

Siendo un agente preventivo, proponemos emplear al DDC en las poblaciones con elevado índice de exposición al mercurio, como son, los trabajadores de industrias metalúrgicas, mineras y de pinturas. A fin de disminuir el grado de absorción y acumulación en su organismo, evitando así el daño renal.

Debido a que el DDC requiere de una menor dosis de tratamiento, comparado con otros agentes quelantes -como la penicilamina (Aposhian, 1958)- las reacciones secundarias pueden evitarse.

Antes de implementar al dietilditiocarbamato formalmente como tratamiento preventivo, se requiere, no obstante, de un intenso estudio acerca de la farmacocinética y estabilidad del complejo Hg(DDC).

BIBLIOGRAFIA

- Akerman, K. E. O. and Wikström, M. F. K. (1976) *FEBS Lett.* **68**, 191-197.
- Alberts, B., Bray, O., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, D. (1990). *Biología Molecular de la Célula*. Omega, Barcelona; 517-547.
- Ambudkar, I. S., Smith, M. W., Phelps, P. C., Regec, A. L. and Trump, B. F. (1988) *Toxicol. Ind. Health.* **4**, 107-123.
- Abd-Elfattah (1981) *Mol. Phar.* **20**, 492-497.
- Aphoshian, H. V. (1958) *Science* **128**, 93.
- Bardsley, M.E. and Brand, M.D. (1982) *Biochem. J.* **202**, 197-201.
- Beatrice, M.C., Palmer, J. W. and Pfeiffer, D. R. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 8663-8671.
- Beatrice, M. C., Stiers, D.L. and Pfeiffer, D.R. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7161-7171.
- Bellomo, G., Jerwell, S.A., Thor, H. and Orrenius, S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6842-6846.
- Benov, C.L., Benchev, C.I. and Monovich, H.O. (1990) *Chem. Biol. Interactions* **76**, 321-332.
- Broekemeier, K.M., Dempsey, M.E. and Pfeiffer, D.R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 7826-7830.
- Broekemeier, K.M., Schmid, C.P., Schmid, O.H.H. and Pfeiffer, R.D. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 105-113.
- Carafoli, E. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 395-433.
- Chávez, E., Briones, R., Michel, B., Bravo, C. and Jay, D. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **242**, 493-497.
- Chávez, E. and Jay, D. (1987-a) *J. Bioenerg. Biomem.* **19**, 571-580.
- Chávez, E., Jay, D. and Bravo, C. (1987-b) *J. Bioenerg. Biomem.* **19**, 285-295.
- Chávez, E. and Holguín, J. A. (1988) *J. Bio. Chem.* **263**, 3582-3587.
- Chávez, E., Zazueta, C., Diaz, E. and Holguín, J. A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **986**, 27-3
- Chávez, E., Moreno-Sánchez, R., Zazueta, C., Reyes-Vivas, H. and Arteaga, D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1070**, 461-466.

- Crompton, M., Capano, M. and Carafoli, E. (1976) *Eur. J. Biochem.* **69**, 453-462.
- Crompton, M., Ellinger, H. and Costi, A., (1988) *Biochem. J.* **255**, 357-360.
- Ellman, G. L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* **22**, 70-77.
- Fiskum, G. and Cockrell, R. S. (1978) *FEBS Lett.* **92**, 125-128.
- Goodman, G. A., Goodman, S. L., Rall, W. T. and Murad, F. (1986) *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Ed. Médica Panamericana, México.
- Gornall, A. C., Bardawill, C. J. and David, M.M. (1949) *J. Biol. Chem.* **177**, 751.
- Gunnar, S. L. and Martell, E. A., (1971) Stability constants of metal-ion complexes (Alden. and Mowbray. ed.) The Chemical Society Burlington House, London. pag. 390-391.
- Gunter, T. E. and Pfeiffer, D. R. (1990) *Am. J. Physiol.* **258**, C755-C786.
- Guyton, C. A. (1991) *Tratado de Fisiología Médica*. Mc-Graw-Hill-Interamericana de España, Madrid; 357-358.
- Hertel, C., Affolter, H., Marme, D. and Dierks-Ventling, C. (1983) *Biochem. J.* **212**, 567-572.
- Jarvisalo, J. O., Kilpio, J. and Saris, N. E. L. (1980) *Environ. Res.* **22**, 217-223.
- Kendrick, N. C. (1976) *Ann. Biochem.* **76**, 487-501.
- Lehninger, A. L., Carafoli, E. and Rossi, C. S. (1967) *Advances in Enzymology* (Nord. F.F., ed.) Interscience, New York, Vol. 29, pp. 259-320.
- Mahaffey, R. K. (1984) *Bull. N. Y. Acad. Med.* **6**, 196-209.
- Mannevik, B., Axelsson, K. and Larsson, K. (1981) *Methods Enzymol.* **77**, 281-285.
- Marsh, J. D. and Smith, T. S. (1991) *Circulation* **83** (2), 709-711.
- Martens, M. E., Chang, C. H. and Lee, C. P. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **244**, 773-786.
- Moore, C. L. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **42**, 298-304.
- Moore, L., Chen, T., Knapp, H. R., Jr., and Landon, E. J. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 4562-4568.
- Moreno-Sánchez, R., Bravo, C., Gutiérrez, J., Newman A. H., and Chiang, P. K. (1991) *Int. J. Biochem.* **23**, 207-213.

- Pfeiffer, D.R., Kauffman, R.F. and Lardy, H. A. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4165-4171.
- Quinlan, G. J., Hallewell, B., Moorhouse, C. P. and Gutteridge, J. M. C. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 962, 196-200.
- Reed, K. C. and Bygrave, F. L. (1974) *Biochem. J.* 140, 143-155.
- Riley, W. N., Jr., and Pfeiffer, D. R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 12416-12425.
- Stryer, L., (1990) *Bioquímica*. Reverté, S.A., España; 289-316, 553-579.
- White, A., Handlev, P. L., Smith, L. E., Hill, L. R., y Lehman R.I. (1983) *Principios de Bioquímica*. Mc Graw-Hill de México S. A. de C. V. 598-599.
- Zoccarato, F. and Nicholls, D. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 333-338.