

Protección por captopril de los efectos nefrotóxicos del mercurio

Edmundo Chávez* ♦ Cecilia Zazueta* ♦ Concepción Bravo* ♦ Horacio Reyes-Vivas*
Julieta Pichardo* ♦ Rita Chávez*

Resumen

Los experimentos mostrados en el presente trabajo señalan que el Hg^{2+} a concentraciones relativamente bajas (5 a 10 μM), produce un daño en la membrana interna mitocondrial. Este daño da como resultado la formación de canales iónicos que permiten la salida espontánea del Ca^{2+} de la matriz. Aunado a lo anterior la formación de canales produce el equilibrio del gradiente quimiosmótico, dando como resultado el abatimiento del potencial transmembranal y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Los experimentos llevados a cabo *in vivo*, señalan que el mercurio produce necrosis tubular aguda en el tejido renal. Estos efectos tóxicos del Hg^{2+} son prevenidos *in vitro* por la adición de 15 μM de la droga inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina, captopril. En los experimentos *in vivo* se demuestra que la inyección intraperitoneal de captopril (40 mg/kg) protege completamente de la disfunción mitocondrial producida por la intoxicación mercurial.

Summary

*The experiments referred to in this article point to the fact that relatively low concentrations of Hg^{2+} (5-10 μM) produce damage to the internal mitochondrial membrane. This damage results in the formation of ionic channels that allow the spontaneous efflux of Ca^{2+} from the matrix. Together with this, the formation of channels produces the balance of the chemo-osmotic gradient, resulting in the overcoming of the transmembrane potential and the uncoupling of oxidative phosphorylation. The experiments carried out *in vivo*, point to the fact mercury produces acute tubular necrosis of kidney tissue. These toxic effects produced by Hg^{2+} *in vitro* with the addition of 15 μM of the inhibition of the angiotensin converting enzyme, captopril. *In vivo* experiments show that intraperitoneal injection of captopril (40 mg/kg) completely protects from mitochondrial dysfunction produced by mercurial intoxication.*

Introducción

La presencia de metales pesados en el medio ambiente es ahora un problema de salud en nuestra sociedad. Se sabe que algunos metales como el plomo, cadmio, cromo y mercurio, producen efectos patológicos de tipo neurológico, psicomotores y renales.¹⁻⁴ De estos metales, el mercurio (Hg) ha causado severos cuadros tóxicos. En Japón en la década de los cincuenta, se presentaron 700 casos de envenenamiento por consumir peces de la Bahía de Minamata, hacia la cual se había desechado mercurio metálico.⁵ En 1964 se produjo otro caso de envenenamiento masivo por compuestos alquimercuriales.⁶ En Irak, entre 1971 y 1972, existieron diversos casos de envenenamiento al ingerir semillas que habían sido tratadas con un fungicida mercurial.⁶

La intoxicación por mercurio puede efectuarse por diferentes vías, ya sea por inhalación del medio ambiente o mediante la ingesta de alimentos contaminados o fármacos. Ha sido reportado que aproximadamente el 80 por ciento del mercurio inhalado es retenido y que la absorción gastrointestinal del Hg en la forma de metil mercurio es del 100 por ciento, en tanto que las sales inorgánicas del mercurio se absorben un 7 por ciento.

Los efectos tóxicos del mercurio en el organismo implican disfunciones metabólicas, hormonales, neuronales, inmunológicas y hemodinámicas.⁷ Estudios realizados en tejidos y células aisladas señalan que el mercurio produce alteraciones en el movimiento del Ca^{2+} por medio de la membrana plasmática,⁸ e induce lipoperoxidación en eritrocitos.⁹ Por otro lado se sabe que la acumulación de Hg^{2+} en el tejido renal, induce insuficiencia renal.¹⁰ A nivel celular, la nefrotoxicidad inducida por Hg^{2+} , se caracteriza por un hinchamiento del retículo endoplásmico y de las mitocondrias.¹¹ En estos últimos organelos, la fijación de Hg^{2+} induce pérdida de su capacidad para formar ATP y además estimulación de una activación de la enzima adenosin trifosfatasa.

En este trabajo analizamos el efecto del mercurio sobre la capacidad de las mitocondrias de riñón de captar Ca^{2+} y formar un potencial transmembranal. Se analizó también el efecto del captopril, una droga que inhibe a la enzima convertidora de angiotensina I, y que ha sido postulada como atrapadora de radicales superóxido. Los resultados señalan que el mercurio a una concentración de entre 5 y 10 μM induce la salida del calcio acumulado en la matriz mitocondrial, colapso del potencial transmembranal e hinchamiento de las

* Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano L. México, D.F. 014080, México.
Trabajo de ingreso del Dr. Edmundo Chávez Cosío leído el 26 de agosto de 1992.

mitocondrias. Cuando el mercurio fue administrado *in vivo* a ratas por vía oral, las mitocondrias aisladas de riñón presentaron el mismo cuadro patológico. Estos efectos fueron suprimidos por la administración de captopril.

Material y métodos

Las mitocondrias fueron aisladas de riñones de ratas wistar que pesaban aproximadamente 250 g. Los riñones se homogeneizaron en sacarosa 0.25 M, que contenía 1 mM de EDTA, el pH de esta solución se ajustó a 7.3 con Tris base. Las mitocondrias se separaron del homogenado por centrifugación diferencial según el método reportado por Chávez y cols.¹² La proteína mitocondrial se determinó según el método de Lowry y cols.¹³ El consumo de oxígeno se determinó plorográficamente con un electrodo de tipo Clark. El volumen mitocondrial se analizó por cambios en la densidad óptica a 540 nm. El transporte de Ca^{2+} a través de la membrana interna mitocondrial fue seguido espectrofotométricamente a dos longitudes de onda (685-675) utilizando el indicador metalocrómico arsenazo III.¹⁴ Alternativamente, el transporte de calcio se determinó utilizando ^{45}Ca con una actividad específica de 1000 cpm por nmol, mediante el método de filtración en Millipore.¹⁵ Para los experimentos *in vitro* el Hg^{2+} fue administrado intraperitonealmente (4mg/kg de peso) y los efectos tóxicos se analizaron 24 horas después. El captopril fue administrado también intraperitonealmente a una dosis de 40mg por Kg de peso. Como control se administró cisteína a la misma dosis. Para los estudios de microscopía de luz los riñones fueron fijados por perfusión vascular con 4 por ciento de formaldehído y 1 por ciento de flutalaldehído en un amortiguador de fosfato 10 mM en ratas anestesiadas.¹⁶

Resultados

El experimento presentado en la Figura 1, trazo A, muestra que la adición de 20 μM de mersalyl a mitocondrias que han acumulado Ca^{2+} por oxidación de succinato, no induce un cambio en la permeabilidad membranar, traducido en salida del catión acumulado. En contraste, el trazo B señala que la adición de Hg^{2+} a concentraciones de 5 y 6 μM , produce una salida del calcio intramitocondrial. Una pérdida del Ca^{2+} acumulado en la matriz, también fue observada con concentraciones de 3 y 4 μM ; pero bajas concentraciones de Hg^{2+} (1 o 2 μM) no produjeron ningún cambio en la concentración del Ca intramitocondrial. El efecto del Hg sobre la permeabilidad de la membrana es inhibido por la adición de 12.5 μM de cisteína, cuando este aminoácido es añadido previamente al medio de incubación (Figura 2A). Sin embargo, cuando la cisteína es añadida después del mercurio, no hay una reversión del efecto del metal pesado (Figura 2B). La falta de efecto de la cisteína en revertir la salida del Ca^{2+} cuando es añadida después del mercurio, sugiere que el efecto de este metal es irreversible. Para probar esta posibilidad se

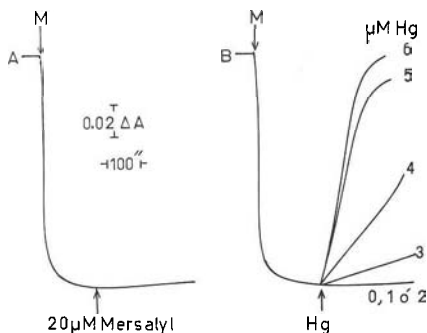


Figura 1. El efecto del Mersalyl y concentraciones crecientes de mercurio sobre el contenido de Ca^{2+} intramitocondrial. 2 mg de proteína mitocondrial (M) fueron añadidos a un medio de incubación que contenía: 250 mM de sacarosa, 10 mM de succinato, 10 mM de acetato, 10 mM de HEPES pH 7.3, 5 μM ADP, 50 μM de CaCl_2 , 10 μg de rotenona 5 μg de oligomicina, y 50 μM de Arsenazo III. Volumen final 3 ml. Temperatura 25° C.

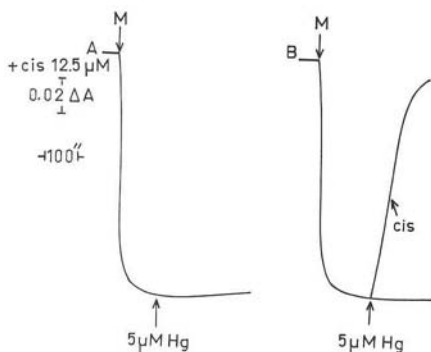


Figura 2. El efecto de la Cisteína sobre la acción de Hg^{2+} en el contenido de Ca^{2+} intramitocondrial. Las condiciones experimentales fueron como se indica en la leyenda para la Figura 1.

analizó el efecto de la cisteína sobre la fijación del Hg^{2+} a la membrana interna mitocondrial. La Figura 3 señala que cuando la mezcla de incubación contenía 5 μM de Hg^{2+} , las mitocondrias fijan aproximadamente 6 nmol de Hg^{2+} por mg de proteína. La adición de 200 μM de cisteína induce una rápida caída en la cantidad de Hg^{2+} unido a la membrana mitocondrial hacia valores de 1.6 nmol/mg. Esto demuestra que el daño producido por la unión del mercurio a la mitocondria es permanente.

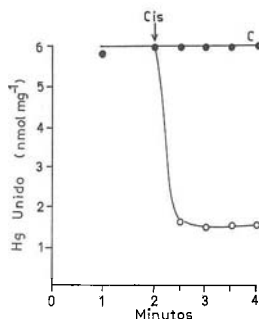


Figura 3. Efecto de la Cisteína sobre la fijación de mercurio a la membrana mitocondrial. 2 mg de proteína mitocondrial se añadieron a un medio igual al descrito para la Figura 1. Después de 1 min de incubación, 5 μ M de $^{203}\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ fue añadido. A los tiempos indicados alícuotas de 0.2 ml fueron filtradas a través de un filtro Millipore para estimar la radiactividad.

Un aumento en la permeabilidad membranar es acompañado por una disminución paralela en el potencial negativo interno mitocondrial. Como se observa en la Figura 4, cuando se añade al medio de incubación 50 μ M de Ca^{2+} una parcial despolarización membranar tiene lugar, la cual es seguida de una recuperación. Sin embargo la subsecuente adición de 5 μ M de Hg^{2+} induce una completa pérdida del potencial

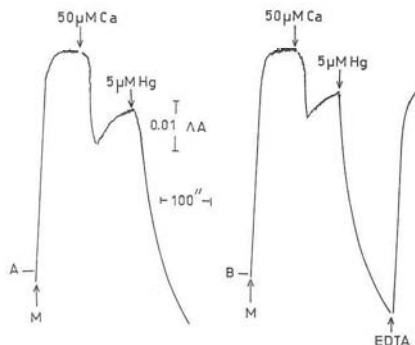


Figura 4. Efecto del Hg^{2+} sobre el potencial transmembranar. 2 mg de proteína mitocondrial fueron añadidos a 3 ml de un medio similar al descrito para la Figura 1, excepto que 10 μ M de salina fue añadida en lugar de Arsenazo III.

transmembranar (Trazo A). El potencial es reestablecido después de la adición del quelante de Ca^{2+} EDTA. Esto último indica que el Hg^{2+} induce un ciclo de Ca^{2+} a través de la membrana interna, este ciclo produce la despolarización membranar; cuando el Ca^{2+} es atrapado por el quelante se interrumpe el ciclo y el potencial se reestablece.

Después de analizar estos resultados experimentales nos pareció interesante investigar si el captopril era capaz de producir un efecto protector sobre los efectos deletéreos del Hg^{2+} en mitocondrias aisladas. La figura 5A muestra el efecto de concentraciones crecientes de captopril sobre la

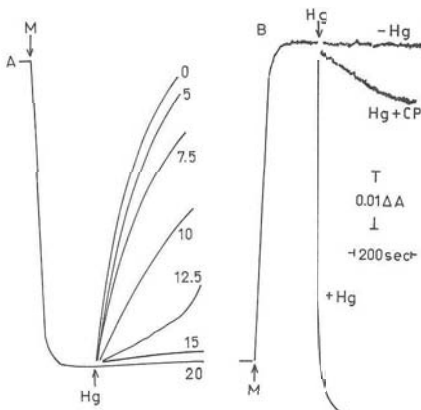


Figura 5. El efecto protector de distintas concentraciones de captopril sobre la salida de Ca^{2+} inducida por Hg^{2+} . Las condiciones experimentales fueron esencialmente como las descritas en la Figura 1, excepto por la adición de distintas concentraciones de captopril.

salida de Ca^{2+} intramitocondrial inducida por Hg^{2+} . Como puede observarse, una rápida salida de Ca^{2+} tiene lugar, después de la adición de 10 μ M de Hg^{2+} . Sin embargo, un bien definido efecto protector es inducido por concentraciones crecientes de captopril. Una completa protección es obtenida por la adición de 15 μ M de Captopril (CP). Debe mencionarse que el CP no restaura la entrada de Ca^{2+} en mitocondrias tratadas con Hg^{2+} . El experimento de la Figura 5B indica que el captopril previene de la despolarización membranar inducida por Hg^{2+} .

Como se demostró con los anteriores experimentos, bajos niveles de captopril previenen, en mitocondrias, de los efectos tóxicos del mercurio sobre la homeostasis del Ca^{2+} y la energización transmembranar. En vista de lo anterior se decidió investigar in vivo el efecto protector del captopril sobre el envenenamiento por mercurio. Las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con una dosis alta de biclo-

ruro de mercurio (4 mg/kg). Después de 24 horas, las características funcionales de las mitocondrias aisladas y la morfología ultraestructural de los riñones fueron estudiadas.

Los resultados de la Figura 6 muestran que la captación de Ca^{2+} de las mitocondrias y de las mitocondrias provenientes

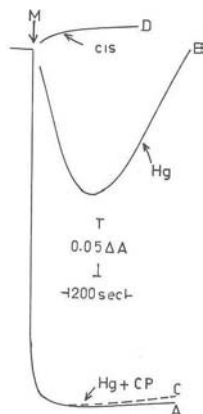


Figura 6. El transporte de Ca^{2+} en mitocondrias provenientes de ratas tratadas con Hg^{2+} , Hg^{2+} más Captopril y Cisteína. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas para la Figura 1.

de las ratas tratadas con Hg^{2+} fue drásticamente diferente. Estas últimas exhibieron una entrada parcial de Ca^{2+} seguida de una rápida salida (Trazo B). En contraste las mitocondrias aisladas de ratas tratadas con mercurio más captopril (Trazo C) acumularon Ca^{2+} a un nivel similar al de las mitocondrias control (Trazo A). Como se observa en la misma Figura la cisteína no protege de los efectos tóxicos del Hg^{2+} (Trazo D).

Un análisis cuantitativo de la entrada de Ca^{2+} en mitocondrias es representado en la Tabla 1. Como se ve, las mitocondrias aisladas de las ratas control, acumularon 56 nmol

Tabla 1

Condiciones	nmol Ca^{2+} mg^{-1}
Control	56
+ Hg^{2+}	9
+ Hg^{2+} + CP	52

Tabla 1. Captación de Ca^{2+} por mitocondrias aisladas de ratas inyectadas con Hg y Hg más Captopril. Las condiciones experimentales fueron esencialmente como las descritas para la Figura 1, excepto que Ca^{2+} radiactivo fue usado.

de Ca^{2+} /mg. En tanto que las mitocondrias provenientes de las ratas tratadas con Hg^{2+} , captaron 9 nmol de Ca^{2+} /mg. En contraste las mitocondrias aisladas de los riñones de ratas tratadas con Hg^{2+} y captopril acumularon Ca^{2+} de una manera similar a los controles (52 nmol/mg).

Previos reportes¹⁷ han demostrado que la fosforilación oxidativa en mitocondrias de riñones de ratas inyectadas con Hg^{2+} estaba desacoplada. De acuerdo con estos reportes, nosotros encontramos que las mitocondrias de ratas intoxicadas con Hg^{2+} tenían un bajo control respiratorio (CR=1). Sin embargo, el control respiratorio de las ratas tratadas con Hg^{2+} y captopril es muy semejante al observado en las mitocondrias control: 3.3 y 3.1 respectivamente (Figura 7).

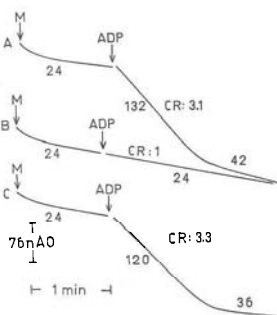
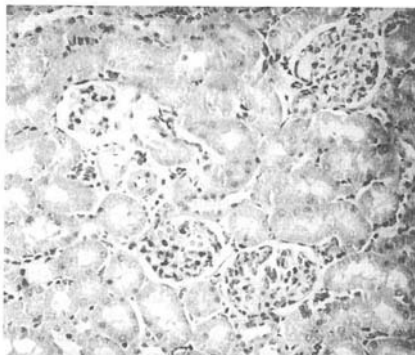
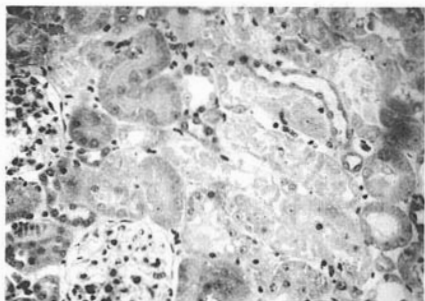
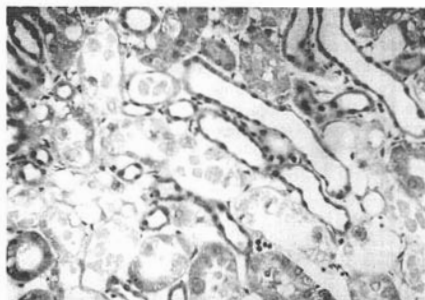


Figura 7. Control respiratorio de las mitocondrias aisladas de ratas tratadas con Hg^{2+} y Hg^{2+} más Captopril. 1.25 mg de proteína mitocondrial fue añadida a 1.0 ml de un medio de incubación, conteniendo: 250 mM de sacarosa; 10 mM de malato; 10 mM de glutamato; 10 mM de fosfato y 10 mM de HEPES, el medio fue ajustado con KCH a pH 7.3.

Reportes de la literatura¹⁸ indican que el mercurio produce cambios histológicos en el tejido renal. De acuerdo con estas observaciones, la Figura 8B señala que el mercurio produce necrosis tubular. Estas alteraciones no fueron observadas en las ratas tratadas con mercurio más captopril (Figura 8C), aunque algunas áreas de necrosis focal fueron observadas.





Discusión

De acuerdo con datos de la literatura,¹⁹ la adición de varios reactivos mercuriales a la membrana mitocondrial es dependiente de varios factores, por ejemplo: la polaridad del reactivo, pH, la composición iónica del medio de incubación y el estado metabólico de las mitocondrias. Sin embargo, la adición de los reactivos para grupos sulfhidrilos inducen una permeabilidad generalizada a los cationes, en vista de que producen un aumento en la salida del Ca^{2+} así como también entrada de K^{+} .²⁰ Los resultados aquí mostrados señalan que el mersalyl, que estimula la entrada de K^{+} en mitocondrias de corazón,²⁰ no aumenta la permeabilidad del Ca^{2+} en las mitocondrias de riñón. De estos resultados parecería que los grupos -SH membranales que regulan los procesos de permeabilidad membranar al Ca^{2+} y al K^{+} , son diferentes. Pecería que el Hg^{2+} es específico para inducir salida de Ca^{2+} .

Las características histoquímicas y bioquímicas de la nefrotoxicidad inducida por Hg^{2+} , han sido estudiadas con anterioridad.¹⁸ Sin embargo, los resultados que se muestran hacen hincapié en el hecho de que el mercurio induce un aumento en la permeabilidad membranar a la salida de Ca^{2+} y un aumento en la permeabilidad a los H^{+} puesto que colapsa el potencial transmembranar.

La terapia para el envenenamiento por mercurio involucra el uso de una amplia variedad de drogas. Por ejemplo d-peni-

cilamina,²¹ EGTA y ditiotreitolo¹¹ y microesferas quelante del Hg^{2+} .²² Nuestro estudio establece que el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, captopril, previene efectivamente el daño renal producido por la intoxicación de Hg^{2+} . Sin embargo, los experimentos *in vitro* demuestran que el captopril es incapaz de revertir el daño nerotóxico por Hg^{2+} . A este respecto debe ser considerado que la constante de afinidad entre el mercurio y los grupos tioles membranales es de 1.5×10^{13} , mientras que la constante de afinidad entre el captopril y Hg^{2+} es de 2×10^7 . Esta diferencia debe tomarse en cuenta para explicar la falla del captopril para remover el mercurio unido a la membrana y revertir sus efectos. Por otro lado posiblemente algunos iones de mercurio podrían estar situados en la membrana en sitios inaccesibles para el captopril.

Los experimentos *in vivo* demuestran que el captopril es efectivo para proteger la morfología y función del tejido renal del daño por mercurio. El efecto protector del captopril correlaciona de manera directa con la cantidad de Hg^{2+} encontrado en las mitocondrias de las ratas inyectadas con Hg^{2+} /mg en las ratas tratadas con Hg^{2+} +CP y 1.8 nmol Hg^{2+} /mg en las ratas control.

El mecanismo por el cual el captopril protege de los efectos del mercurio seguramente se debe al grupo tiol que tiene en su molécula la droga.²⁴ Es fácil que el mercurio se pegue con cierta afinidad al captopril como se demostró por medio de su constante de afinidad (2×10^7). Es posible que el captopril forme un complejo estable con el mercurio, antes de que este metal llegue a los riñones. Por el momento no podemos decir con seguridad si esto es lo que pasa ya que sería necesario tener el compuesto marcado radiactivamente.

Referencias

1. Tsuchiya H, Shima S, Kurita H, Ito T, Kato Y, Kato Y y Tachikawa S Bull. Environ. Toxicol. 1987;38:580-587.
2. Chávez E, Jay D and Bravo C. J. Bioenerg. Biomembr. 1987;19:285-295.
3. Cagiano R, De Silva MA, Renza G, Tortella E, Braghieri D, Parentin C, Zanoli P, Beraldi M, Annau Z and Cuomo V. Neurotox. Teratol. 1990;12:23-28.
4. Wallach S. In Metals Ions in Biology and Medicine, Collier et al. eds. John Libbey Eurotext, Paris, 1990:299-303.
5. Kazantzis G. In Metals in the Environment. Ed. Waldren, H.A. Academic Press, London 1980:333.
6. Amin-Zaki L, Elhasani SB, Majed MA et al. Pediatrics, 1974;54:587-595.
7. Liu J, Kershaw WC and Klaassen CD. In Vitro Cell. Dev. Biol. 1990;26:75-79.
8. Smith MW, Ambudkar IS, Phelps PC, Regec AL, and Trump BF. Biochem. Biophys. Acta, 1987;931:130-142.
9. Rivasor SR, Benov LC, and Benchev IC. Chem. Bio. Interactions, 1984;50:111-119.
10. Sahaphong S, Trump BF, Am. J. Pathol. 1971;63:277-197.
11. Ambudkar IS, Smith MW, Phelps PC, Regec AL, and Trump BF. Toxicol. Ind. Health, 1988;4:107-123.
12. Chávez E, Briones R, Michel B, Bravo C, and Jay D. Arch. Biochem. Biophys. 1985;242:493-497.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. J. Biol. Chem. 1951;14:245-449.
14. Kendrick NC. Anal. Biochem. 1976;76:487-501.
15. Chávez E, Zapata C, Diaz E, and Holguin JA. Biochim. Biophys. Acta, 1989;986:27-32.
16. Glauman B, Glauman H, Bereszycki IK and Trump BF. Virch. Arch. B. Cell. Pathol. 1975;19:281-301.
17. Southard JH and Nitiswojo P. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973;52:921-925.
18. Southard JH, Nitiswojo P and Green D. Fed. Proc. 1974;33:2147-2153.
19. Brierley GP, Knight VA and Seltzer CT. J. Biol. Chem. 1968;243:5035-5042.
20. Srivastava J, and Diwan JJ. Biophys. J., 1983;41:139.
21. Abd-Elfattah AS, and Shamo AC. Mol. Pharmacol. 1981;20:492-497.
22. Margal S, Hirsh J, and Harai I. Arch. Toxicol. 1983;6(Suppl.):300-305.
23. Chávez E, and Holguin JA. J. Biol. Chem., 1988;263:3582-3587.
24. Ondetti MA, and Cushman DW. J. Med. Chem. 1981;24:355-361.