

03062

9
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y
HUMANIDADES

IDENTIFICACION DE LAS ENZIMAS DE LA CADENA
RESPIRATORIA Y SISTEMA FOSFORILANTE
MODULADAS POR Ca^{2+} .

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
BIOL. CECILIA GARCIA PEREZ

MEXICO, D. F.,

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

260344



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DEL INSTITUTO
NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ" BAJO LA
DIRECCIÓN DEL Dr. RAFAEL MORENO SÁNCHEZ.

Los miembros del jurado:

Dr. ARMANDO GÓMEZ PUYOU

Dr. ANTONIO PEÑA DÍAZ

Dr. EDMUNDO CHÁVEZ COSSÍO

Dr. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN

Dr. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ

Esta tesis la dedico a mis padres, los mejores. Por su apoyo incondicional y todo su amor.

Quiero agradecer a los miembros del jurado los comentarios y sugerencias que me hicieron.

Le agradezco al Dr. Juan Pablo Pardo por haberme ayudado a discutir mi trabajo.

Le agradezco al Dr. Federico Martínez por todo su apoyo para que pudiera escribir la tesis.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	14
HIPÓTESIS.....	14
METODOLOGÍA.....	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
temperatura y tiempo de preincubación.....	21
fosfato.....	23
magnesio.....	25
espermina.....	27
estimulación de la fosforilación oxidativa.....	29
relación P/O.....	34
donadores artificiales.....	35
acarreador de dicarboxílicos y Sitio 1.....	40
potencial transmembranal.....	41
arsenilación oxidativa.....	44
síntesis de ATP limitada al 50%.....	48
porcentaje de reducción del citocromo b.....	52
respiración desacoplada.....	55
CONCLUSION.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	60

ABREVIATURAS

ANT, translocador de nucleótidos de adenina

CAT, carboxiatractilósido

Co, coeficiente de control de flujo

IF₁, proteína inhibidora de la F₁-ATPasa

2-OG, 2-oxoglutarato

2-OGDH, 2-oxoglutarato deshidrogenasa

DHs, deshidrogenasas dependientes de NAD⁺; piruvato deshidrogenasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa.

F.O., fosforilación oxidativa

TMPD, tetrametil-p-fenilendiamina

CCCP, carbamilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona

DTT, ditionietol

PMS, metasulfato de fenazina

Q₁, quinona 1

dq, duroquinona

DCPIP, diclorofenol-indofenol

$\Delta\Psi$, diferencia en el potencial transmembranal

$\Delta\mu_{H^+}$, gradiente electroquímico de protones

EGTA, ácido tetraacético (β -aminoetil) etilenglicol éter

HEDTA, ácido triacético (2-hidroxi) etilendiamina

TCA, ácido tricloroacético

PCA, ácido perclórico

La respiración mitocondrial acoplada a la síntesis de ATP mediante el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$), se conoce como fosforilación oxidativa. Esta vía consta de dos sistemas: el oxidativo y el fosforilante. El primero está formado por las enzimas transportadoras de sustratos, el ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones. El sistema fosforilante está constituido por la ATP sintetasa, la translocasa de los nucleótidos de adenina y el acarreador de fosfatos. El gradiente electroquímico de protones o fuerza protonmotriz es la suma de la diferencia de potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) y la diferencia de pH (ΔpH) a ambos lados de la membrana interna mitocondrial (Mitchell, 1966).

La permeabilidad pasiva a los protones gobierna el estado 4 de la respiración mitocondrial. En el estado 3, en las mitocondrias del hígado de rata, los componentes de la cadena respiratoria y del sistema fosforilante se distribuyen el control de la vía (Kunz *et al.*, 1988; Moreno-Sánchez, 1985b; Moreno-Sánchez, 1985a; Groen *et al.*, 1982; Wanders *et al.*, 1984; Gellerich *et al.*, 1983; Devin *et al.*, 1996).

Se ha argumentado que la elevación en la concentración del Ca^{2+} en el citosol es una de las señales utilizadas por las células para incrementar la fosforilación oxidativa a través de la activación de las deshidrogenasas de la matriz mitocondrial sensibles a Ca^{2+} (Hansford, 1985; Moreno-Sánchez y Torres-Márquez, 1991; McCormack *et al.*, 1990; Patel *et al.*, 1988; Leisey *et al.*, 1993; Miyata *et al.*, 1991).

El efecto del Ca^{2+} sobre la fosforilación oxidativa en todas las mitocondrias de mamífero estudiadas hasta la fecha se debe, en gran parte, a la estimulación de estas tres deshidrogenasas de la matriz mitocondrial, dependientes de NAD^+ (DHs) (Hansford, 1985;

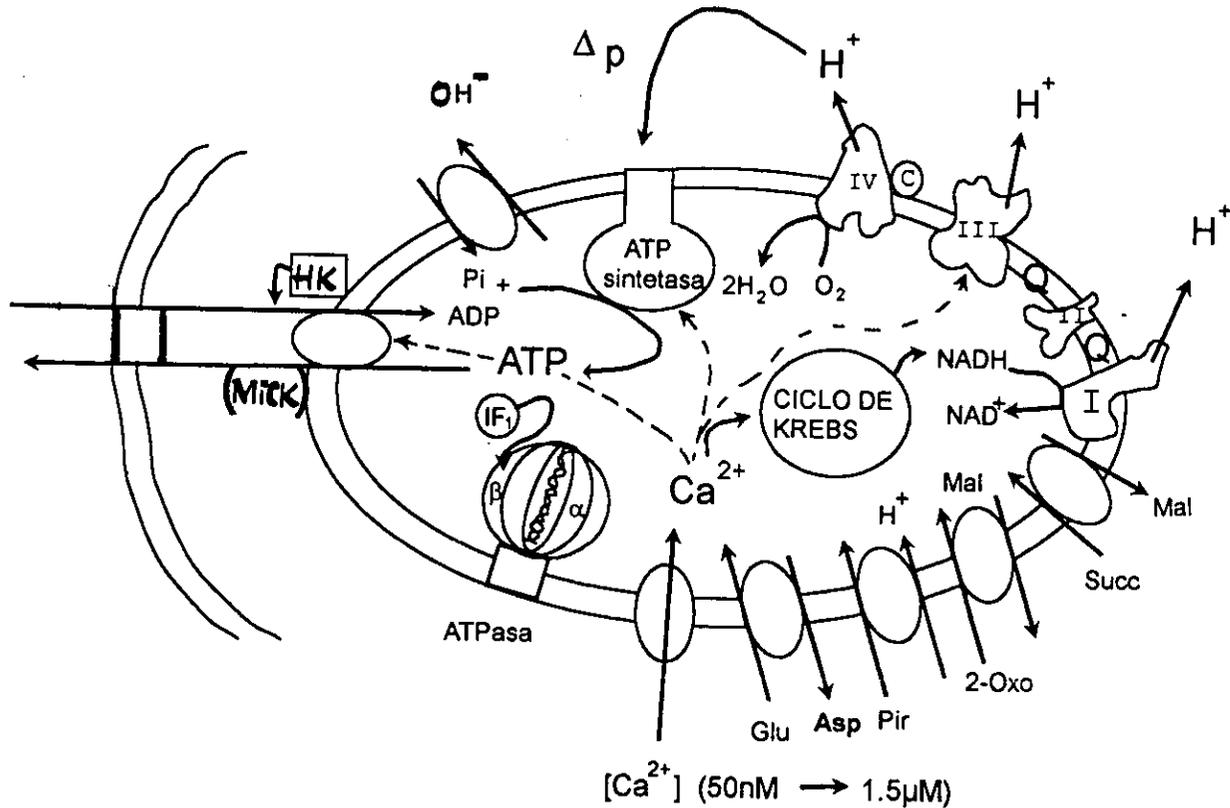


Figura A. Representación esquemática de la fosforilación oxidativa. Los metabolitos provenientes del catabolismo de proteínas, ácidos grasos y carbohidratos son los sustratos del ciclo de Krebs. Este ciclo genera el NADH, sustrato de la cadena respiratoria mitocondrial. Las 3 bombas redox de la cadena respiratoria bombean protones hacia la cara externa de la membrana interna. El gradiente electroquímico formado es utilizado por la ATP sintetasa para formar ATP a partir de ADP y Pi. IF₁ es la subunidad inhibitoria de la actividad hidrolítica de la ATP sintetasa; la unión de IF₁ a la enzima se favorece a pH básico o por disminución de Δp ; se indican las subunidades α y β ; la subunidad γ de la ATP sintetasa se representa como una espiral en medio de las subunidades α y β . El Ca²⁺ es modulador de la actividad enzimática de la fosforilación oxidativa: el Ca²⁺ estimula a 3 enzimas del ciclo de Krebs, pero no está claro todavía, si además estimula algún otro sitio de la vía (indicado con líneas punteadas). □, complejo de porina con cinasas asociadas con el translocador ATP/ADP; Δp , gradiente electroquímico de protones; Glu, glutámico; pir, piruvato; mal, malato; succ, succinato; MiCK, creatina cinasa mitocondrial.

McCormack *et al.*, 1990). El Ca^{2+} activa a la piruvato deshidrogenasa fosfatasa y disminuye la K_m para los sustratos de la isocitrato y 2-oxoglutarato deshidrogenasas.

En las mitocondrias del hígado de rata incubadas con concentraciones fisiológicas de Na^+ y Mg^{2+} , las DHs pueden ser activadas al aumentar la concentración del Ca^{2+} extramitocondrial dentro del intervalo fisiológico esperado, $50 \text{ nM} \rightarrow 5 \text{ } \mu\text{M}$ (McCormack, 1985).

Sin embargo, existen evidencias del control de la fosforilación oxidativa por Ca^{2+} mediante mecanismos independientes de estas DHs.

Evidencias del efecto del Ca^{2+} sobre otras enzimas de la fosforilación oxidativa.

En 1985 Moreno-Sánchez reportó que la concentración de Ca^{2+} externo modificaba la velocidad de síntesis de ATP en las mitocondrias del hígado de rata. Esta modulación era sensible a Pi y Mg^{2+} . La concentración del Ca^{2+} externo afectaba el contenido de Ca^{2+} total y era dependiente del tiempo de preincubación. Los resultados implican que el aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico modula la concentración del Ca^{2+} intramitocondrial y ésta modula la fosforilación oxidativa.

Con los sustratos del Ciclo de Krebs, Moreno-Sánchez (1985) observó una estimulación de la respiración en estado 3 al variar la concentración de Ca^{2+} externo de 10^{-9} M a 10^{-6} M , implicando a las deshidrogenasas como puntos sensibles a esta estimulación. Sin embargo, también observó activación cuando el sustrato era succinato, desligando el efecto de las deshidrogenasas dependientes de NAD^+ . Moreno-Sánchez (1985a), reportó la relación ADP/O, indicando que el efecto del Ca^{2+} sobre el estado 3

de la respiración no se debía al desacoplamiento. Asimismo, el Ca^{2+} activó un 35% la respiración desacoplada, es decir, las enzimas de la cadena respiratoria.

El aumento en la concentración de Ca^{2+} externo ($10^{-9} \text{ M} \rightarrow 10^{-6} \text{ M}$), además de incrementar la síntesis del ATP, produjo un efecto recíproco sobre los coeficientes de control de flujo (Co) de la ATP sintetasa ($0.20 \rightarrow 0.05$) y la translocasa ATP/ADP ($0.10 \rightarrow 0.46$).

Dentro del análisis cuantitativo de la teoría del control metabólico (Kacser y Burns, 1973; Heinrich y Rapoport, 1974), el Co indica el grado de control ($0 \rightarrow 1$; $1=100\%$) que ejerce una enzima sobre la vía.

La reciprocidad dada en los Co de la ATP sintetasa y la ATP/ADP translocasa también se observó en mitocondrias de corazón y de riñón de rata al incrementar la concentración de Ca^{2+} (Moreno-Sánchez *et al.*, 1991) o al variar la concentración de fosfato (Kunz *et al.*, 1988).

En las mitocondrias de corazón de rata en presencia de sustratos conectados al NADH, se observó una dependencia del consumo de oxígeno con respecto a la relación NADH/NAD^+ mitocondrial (Moreno-Sánchez *et al.*, 1990). El resultado corroboró lo propuesto por Koretsky y Balaban (1987) para las mitocondrias de hígado de rata.

En el trabajo de Moreno-Sánchez *et al.* (1990), el aumento en la concentración de Ca^{2+} ($5 \rightarrow 400 \text{ nM}$) provocó un aumento en la respiración (120%) con piruvato, paralelo al aumento en la reducción del $\text{NAD}^+(\text{P})$ (28%) mitocondrial. La activación directa del Ca^{2+} sobre la piruvato deshidrogenasa se observa como un aumento en uno de los productos de ésta, el NADH, y el incremento correspondiente en la actividad de la cadena respiratoria. Sin embargo, al aumentar la concentración de Ca^{2+} de

5 nM a 130 nM, utilizando 2-oxoglutarato (2-OG) 1 mM, se produjo un incremento en la respiración de estado 3 entre el 70 y el 90%, sin que hubiera un cambio en la reducción del NAD(P)H, lo cual indica que tanto antes (productores) como después (consumidores) del NADH existen enzimas susceptibles al Ca^{2+} .

En las mitocondrias de hígado de rata, Murphy *et al.* (1990) observaron una estimulación de la respiración en estado 3 del 152.7 % con 1.5 μM de Ca^{2+} en presencia de succinato con una $K_{0.5}$ de 0.9 μM . Ya que Murphy *et al.* (1990) no reportaron la relación ADP/O, podría ser que el efecto se debiera a un desacoplamiento inducido por la acumulación masiva de Ca^{2+} y a su posterior reciclaje a través de la membrana interna por acción del intercambiador de $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$. Tal estimulación no se observó en presencia de TMPD 100 μM como sustrato de la citocromo oxidasa.

La estimulación de la fosforilación oxidativa por Ca^{2+} con succinato 5 mM o durohidroquinona 1 mM (92.4% de estimulación) involucra a las dos enzimas de la cadena respiratoria, el Complejo III y la citocromo oxidasa, y a las enzimas del sistema fosforilante. La respiración con TMPD sólo involucra a la citocromo oxidasa y a las enzimas del sistema fosforilante. Esto les llevó a concluir (Murphy *et al.*, 1990) que la activación por Ca^{2+} sobre la fosforilación oxidativa se daba a nivel del Complejo III de la cadena respiratoria. Dicha estimulación fue sensible a espermina, lo cual sugiere que la estimulación observada está mediada por la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial.

El efecto activador del Ca^{2+} sobre la respiración en estado 3 en las mitocondrias de hígado de rata depende de la temperatura (Murphy *et al.*, 1990; Moreno-Sánchez y Torres-Márquez, 1991), teniendo una máxima estimulación a 34°C (Moreno-Sánchez y

Torres-Márquez, 1991) cuando se incuban las mitocondrias con succinato-rotenona durante 6-7 minutos.

Murphy *et al.* (1990) observaron estimulación de la respiración por Ca^{2+} en mitocondrias desacopladas, a 30°C (18.7%) y a 37°C (51.8%), implicando un efecto del Ca^{2+} a nivel de la cadena respiratoria o el transporte de succinato, ya que no se ha encontrado efecto del Ca^{2+} sobre la succinato deshidrogenasa (Panov y Scaduto, 1995; Murphy *et al.* 1988; Hatefi, 1985).

La alta estimulación observada en el estado 3, en comparación con la del estado 4, (Murphy *et al.*, 1990), se atribuyó a un efecto del Ca^{2+} sobre algún componente del sistema fosforilante, como la ATP sintetasa o el translocador ATP/ADP.

Modulación por Ca^{2+} de la cadena respiratoria.

La regulación por Ca^{2+} de la fosforilación oxidativa no es exclusiva de las deshidrogenasas dependientes de NAD^{+} , sino que existen sitios potenciales del efecto del Ca^{2+} . En el trabajo de Moreno-Sánchez (1985a) la estimulación que el Ca^{2+} ejercía sobre la respiración desacoplada, demostraba que el efecto del Ca^{2+} se centraba sobre las enzimas de la cadena respiratoria.

En las partículas submitocondriales (PSM) de la placenta humana, con $1\ \mu\text{M}$ de Ca^{2+} se estimuló un 56% la actividad de la NADH-DCPIP reductasa, 133% la actividad de la NADH-citocromo c reductasa y 162% la actividad de la succinato-citocromo c reductasa (Garduño *et al.*, 1992). No hubo estimulación de la succinato deshidrogenasa, la citocromo oxidasa y la actividad del translocador ATP/ADP. Los resultados mostraron que en las PSM de la placenta humana, el Ca^{2+} estimula las actividades de los Complejos I y III de la cadena respiratoria.

En las PSM de corazón de bovino se observó que, a concentraciones milimolares, el Ca^{2+} influencia la actividad de la NADH oxidasa (Kotlyar *et al.*, 1992) al estabilizar la forma inactiva del Complejo I (Kotlyar y Vinogradov, 1990). Sin embargo, con concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} , Panov y Scaduto (1995) no encontraron estimulación de las actividades de la NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa en las PSM de corazón de rata.

Las mitocondrias de hígado de rata presentaron un incremento en su volumen interno en presencia de vasopresina y agonistas α -adrenérgicos, debido al aumento en la concentración de Ca^{2+} (Halestrap *et al.*, 1986). El aumento en la concentración de Ca^{2+} era de origen intramitocondrial, por su sensibilidad al rojo de rutenio. El aumento en el volumen mitocondrial incrementó el consumo de oxígeno a nivel de las flavoproteínas y la poza de quinonas (Halestrap y Dunlop, 1986). Sin embargo, en las mitocondrias de hígado de rata el aumento por Ca^{2+} en la reducción del citocromo b sólo se observó en presencia de CoA (Otto y Ontko, 1982), por lo que se sugirió que el sitio de acción de Ca^{2+} era a nivel de las enzimas de la β -oxidación.

Modulación del translocador ATP/ADP por Ca^{2+} .

El incremento en el volumen mitocondrial estimuló la respiración en estado 3 (Devin *et al.*, 1996) en las mitocondrias de hígado de rata. Se observó un aumento del $\Delta\Psi$ (155 \Rightarrow 185 mV) al incrementar la osmolaridad. De hecho, tal aumento en la osmolaridad provocó que la velocidad del estado 3 se aproximara a la del estado 4, coincidiendo con la elevación en el $\Delta\Psi$.

Asimismo, el incremento en la osmolaridad (100 \Rightarrow 225 \Rightarrow 400 mosM) disminuyó el coeficiente de control de flujo

del translocador (Co_{ANT})($0.7 \Rightarrow 0.5 \Rightarrow 0.34$). Estos resultados concuerdan con los reportados por Mildaziene *et al.* (1995) en cuanto a la relación existente entre la disminución de la velocidad de la cadena respiratoria y la disminución en el Co_{ANT} , y con varios trabajos en donde el aumento de la velocidad de respiración de estado 3 y de la fosforilación oxidativa se acompaña de un aumento del Co del translocador de ATP/ADP (Moreno-Sánchez, 1985a; Groen *et al.*, 1982). Sin embargo, el efecto contrario (aumento en la velocidad y disminución en el Co del translocador de ATP/ADP) también se ha observado con las mitocondrias de corazón de rata (Moreno-Sánchez *et al.*, 1991; Doussiere *et al.*, 1984).

En las mitocondrias de corazón de rata, el Ca^{2+} moduló el coeficiente de control de flujo(Co) de la translocasa de ATP/ADP sólo en condiciones del 60% de la velocidad del estado 3 de la respiración (Mildaziene *et al.*, 1995). A velocidades altas, el Co de la translocasa fue cero. Sin Ca^{2+} , el Co de la translocasa aumentó ($0.06 \rightarrow 0.30$) al incrementar la concentración de 2-oxoglutarato ($1 \rightarrow 10$ mM), mientras que con $1 \mu M$ de Ca^{2+} el Co del translocador aumentó de 0.53 a 0.63.

Asimismo, con las tres concentraciones de 2-OG que se utilizaron, el Ca^{2+} (5 nM $\Rightarrow 1 \mu M$) incrementó el Co del translocador: $0.06 \Rightarrow 0.53$, con 1 mM; $0.07 \Rightarrow 0.57$, con 5 mM y $0.30 \Rightarrow 0.63$, con 10 mM. Con la 2-OGDH totalmente activada por el sustrato (10 mM), el translocador ejerce un 30% de control en ausencia de Ca^{2+} ; y aumenta con $1 \mu M$ de Ca^{2+} , sugiriendo que la estimulación por Ca^{2+} reside además de la 2-OGDH, en algún otro componente de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de corazón. En condiciones subsaturantes de 2-OG, el Ca^{2+} incrementó el Co del translocador al activar a la 2-OGDH ya que en ausencia de Ca^{2+} el control recae sobre esta enzima y el translocador no ejerce control

($Co=0.06$). La activación de la 2-OGDH por el Ca^{2+} provocó un incremento en el control del translocador. Sin embargo, la disminución en el Co de una enzima no necesariamente indica la activación de ésta, de acuerdo con el control paradójico propuesto por Kholodenko y Brown (1996). El Ca^{2+} sólo estimuló la respiración desacoplada con 2-oxoglutarato, pero no con succinato, por lo que los autores (Mildaziene *et al.*, 1995) sugirieron que el efecto del Ca^{2+} era a nivel de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa. Contrario a esto, Moreno-Sánchez *et al.* (1991) reportaron que la activación de la 2-OGDH y del ciclo de Krebs por Ca^{2+} disminuía significativamente el coeficiente de control del translocador, evidencia de un efecto del Ca^{2+} también sobre el translocador.

En un trabajo posterior Mildaziene *et al.* (1996) reportaron una estimulación por el Ca^{2+} sobre la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de corazón de rata. No observaron estimulación con succinato. Con 2-OG 1 mM, el Ca^{2+} estimuló un 123% la respiración en el estado 3 mientras que con 2-OG 10 mM sólo estimuló un 45%. Al determinar la dependencia de la respiración por el potencial membranal, con y sin Ca^{2+} , encontraron que el Ca^{2+} estimulaba tanto al sistema oxidativo como al fosforilante, pero no a la permeabilidad pasiva a protones. Los autores concluyeron que al menos para el sistema oxidativo, con concentraciones limitantes de 2-OG, la estimulación del Ca^{2+} se daba a nivel de la 2-OG deshidrogenasa. La estimulación por el Ca^{2+} a una concentración saturante del 2-OG (10 mM) evidentemente indica un efecto a un nivel diferente de la 2-OGDH. Esto es apoyado por el resultado obtenido por Panov y Scaduto (1996) para las mitocondrias de corazón oxidando glutamato 20 mM, en donde se observó un incremento significativo de la V_{max} de la respiración (314 \Rightarrow 686

ngatO/min/mg) al aumentar la concentración del Ca^{2+} libre de 0 a 1 μM .

La arsenilación oxidativa es el proceso que permite el estudio de la fosforilación oxidativa sin la participación del translocador de ATP/ADP (Gresser, 1981; Moreno-Sánchez, 1985c). El arsenato es un análogo estructural del fosfato. En ausencia del P_i , el arsenato entra a la mitocondria a través del acarreador de fosfatos. En la matriz, la ATP sintetasa forma el complejo ADP-arsenato, que se hidroliza espontáneamente. El ADP utilizado es el endógeno. El ciclo de síntesis-hidrólisis se observa como un incremento en el consumo de oxígeno mitocondrial. El efecto del arsenato sobre el potencial transmembranal es similar al del fosfato, es decir, el arsenato incrementa el $\Delta\Psi$ al disminuir el ΔpH .

Al aumentar la concentración del Ca^{2+} ($10^{-9}\text{M} \rightarrow 10^{-6}\text{M}$) en las mitocondrias de hígado de rata, la arsenilación oxidativa se incrementó un 4.8% mientras que en presencia de ADP, la estimulación fue del doble (11.4%) (Moreno-Sánchez, 1985b); implicando al translocador de ATP/ADP como sitio susceptible de la estimulación por el Ca^{2+} . La arsenilación oxidativa (sin ADP añadido) fue insensible a carboxiatractilósido, corroborando que en este sistema, el translocador está inactivo. En cambio, la fosforilación oxidativa fue abatida en presencia de carboxiatractilósido (CAT) ($136 \rightarrow 17$ nanoatO/min/mg). En la fosforilación oxidativa el control ejercido por el translocador fue alto (0.31), mientras que la ATP sintetasa tuvo un coeficiente de control de flujo menor (0.21).

En cambio, en la arsenilación oxidativa, el control ejercido por la ATP sintetasa aumentó considerablemente (0.74); indicando que en ausencia del translocador, el control se desvía hacia la ATP

sintetasa; ya que en la arsenilación oxidativa el control ejercido por las enzimas de la cadena respiratoria es prácticamente cero (Moreno-Sánchez, 1985b), y entonces, en condiciones normales (fosforilación oxidativa) uno de los puntos de control de la vía es el translocador de nucleótidos de adenina.

Esta distribución del control tiene lugar en el estado estacionario, ya que al aumentar la velocidad de fosforilación (incrementando la concentración de P_i) el control ejercido por el translocador aumenta mientras que el control de la ATP sintetasa disminuye. El control de esta última enzima también va disminuyendo al incrementar la arsenilación oxidativa (aumento de arsenato) (Moreno-Sánchez, 1985b). Los resultados sugieren que tanto el Ca^{2+} como el P_i son factores que modulan la fosforilación oxidativa vía la ATP sintetasa o el translocador de nucleótidos de adenina.

El translocador de las mitocondrias de corazón de bovino fue purificado e incorporado en liposomas (Krämer *et al.*, 1986). Se observó una activación por el Ca^{2+} del transporte de nucleótidos de 140 hasta 1075 $\mu\text{mol/g/min}$ (6-7 veces), con una $K_{0.5}$ de 100 μM . Tal efecto del Ca^{2+} no fue reproducible en las mitocondrias intactas, a menos que se eliminara la membrana externa con digitonina, lo cual podría corroborar la hipótesis de que la translocasa está físicamente unida a la membrana externa vía la creatina cinasa mitocondrial (MiCK) (Saks, 1995).

De hecho en la actualidad se ha postulado (Beutner *et al.*, 1996; Brustovetsky y Klingenberg, 1996) la existencia de un macrocomplejo formado por el translocador, la MiCK, la hexocinasa y la porina que con concentraciones suprafisiológicas de Ca^{2+} (100 $\mu\text{M} \Rightarrow 1 \text{ mM}$) se comporta como un canal y cuyos componentes, la porina y el translocador (Beutner *et al.*, 1996) forman el poro a la

transición de la permeabilidad membranal. se sugiere que la unión del Ca^{2+} a este complejo es a través de las cardiolipinas que se encuentran unidas al translocador (Brustovetsky y Klingenberg, 1996), pero no existe una evidencia directa de la interacción del Ca^{2+} sobre la translocasa.

Modulación de la ATPsintetasa/ATPasa por el Ca^{2+} .

Las células productoras del esmalte de los dientes, manejan altos contenidos de Ca^{2+} . Este tejido es el más calcificado (60% calcio/masa). Se identificó una proteína que une Ca^{2+} con moderada capacidad y baja afinidad en estas células como la subunidad β catalítica del complejo F_1 de la ATP sintetasa mitocondrial (Hubbard y McHugh, 1996). De manera similar, se observó la unión del Ca^{2+} sobre la subunidad β de la ATP sintetasa del cloroplasto así como sobre la subunidad c de la FoATPasa de *E. coli* (Zakharov *et al.*, 1996). Se sugiere que el Ca^{2+} interviene en el mecanismo del flujo de protones a través de la Fo. No se observó la fijación del Ca^{2+} sobre la preparación purificada de FoF₁ mitocondrial de corazón de bovino (Zakharov *et al.*, 1996). Aunque las concentraciones de Ca^{2+} utilizadas fueron de orden suprafisiológico (5-50 μM), el posible papel del Ca^{2+} sobre la ATP sintetasa implica mecanismos reguladores distintos a los encontrados por la IF₁ (proteína inhibidora de la ATPasa), ya que la subunidad β forma parte constitutiva de la proteína mientras que IF₁ es un péptido que está asociado a ésta.

Se encontró que una proteína inhibidora de la ATPasa del músculo esquelético de la rata diferente del péptido de Pullman y Monroy, es capaz de unir Ca^{2+} (Yamada *et al.*, 1981). Sin embargo, el patrón electroforético de la proteína inhibidora, debido a un equilibrio del monómero al dímero sólo fue modificado por Ca^{2+} con

concentraciones milimolares (0.1 y 1 mM). Sólo en presencia de 1 mM de Mg^{2+} se pudo observar la formación del dímero con una concentración baja (0.1 μM) de Ca^{2+} . La presencia de Ca^{2+} en el patrón electroforético del inhibidor convirtió el monómero a su forma activa dimérica, sin embargo, es necesaria la presencia de Mg^{2+} . Dadas las diferentes concentraciones de ambos cationes, se propuso que el inhibidor presenta distintos sitios de unión a cationes. Sin embargo, Klein *et al.* (1982) no encontraron efecto del Ca^{2+} sobre la interconversión de monómero a dímero.

El Ca^{2+} ($0 \Rightarrow 1 \mu M$) estimuló la actividad de la ATPasa ($0.33 \Rightarrow 22.88 \mu mol/min/mg$) y disminuyó la actividad de la ATP sintetasa ($0.12 \Rightarrow 0.04 nmol/min/mg$) sólo en las partículas submitocondriales suplementadas con la proteína inhibidora de la ATPasa, CaBI (Yamada y Huzel, 1989). En las partículas carentes de la CaBI el Ca^{2+} no tuvo efecto. Se concluyó que la actividad de la proteína inhibidora (CaBI) de la ATPasa era modulada por Ca^{2+} .

En cardiomiocitos de rata se observó una estimulación por Ca^{2+} (62%) sobre la hidrólisis de ATP (Das y Harris, 1990b). Esta estimulación fue sensible al rojo de rutenio, implicando al Ca^{2+} intramitocondrial como elemento regulador. Los autores sugirieron que la estimulación del Ca^{2+} sobre la enzima podía darse por incremento en el $\Delta\mu_H^+$ o a través de la proteína inhibidora de la ATPasa, IF_1 . De igual forma, Garduño *et al.* (1992) observaron una estimulación del 250% de la actividad de ATPasa en presencia de 1 μM de Ca^{2+} en mitocondrias aisladas de placenta humana.

En mitocondrias de músculo cardíaco de perro se observó un efecto paradójico del Ca^{2+} (Rouslin y Broge, 1989). El aumento en la concentración de 10 nM a 500 μM de Ca^{2+} disminuyó (48 \rightarrow 37%) el desplazamiento del sitio de unión de la proteína inhibidora de la ATPasa, pero hubo una activación de la

hidrólisis de ATP (3→4 $\mu\text{moles/min/mg}$). La reactivación de la ATPasa y la liberación de la IF_1 disminuye en presencia de 2 mM de MgATP y es sensible a pH. Los autores sugirieron que la estimulación por Ca^{2+} de la hidrólisis del ATP parece ser independiente de la salida de la IF_1 , sin conocerse el mecanismo exacto.

Cabe señalar que sólo se ha observado el efecto del Ca^{2+} sobre la ATPsintetasa en condiciones de hidrólisis, pero no sobre la actividad sintética; de hecho la asociación de la IF_1 a la enzima bloquea la hidrólisis pero no tiene efecto sobre la síntesis (Khodjaev *et al.*, 1990).

OBJETIVO

Establecer las condiciones óptimas para la máxima estimulación de la fosforilación oxidativa por el Ca^{2+} cuando se utiliza succinato como sustrato.

Identificar a las enzimas de la fosforilación oxidativa que se estimulan por el Ca^{2+} cuando se utiliza succinato como sustrato.

HIPOTESIS

Las evidencias presentadas muestran que el aumento en la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial estimula la síntesis de ATP aún sin la participación de las deshidrogenasas sensibles al catión. Cabe esperar que dicha estimulación sea a nivel de los dos sistemas, el oxidativo y el fosforilante.

Dada la estimulación de la hidrólisis por Ca^{2+} sobre la ATP sintetasa, mas no sobre su síntesis, y dado el control que ejerce el translocador sobre la síntesis de ATP (coeficientes de control de flujo y control cinético vía ADP), a nivel del sistema fosforilante, el blanco potencial del Ca^{2+} sería la translocasa de los nucleótidos de adenina.

Las evidencias muestran que el blanco del Ca^{2+} sobre la cadena respiratoria tiene lugar a nivel del Complejo III, pero no se descarta la participación del transportador del succinato.

METODOLOGIA

Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata

Se llevó a cabo según lo descrito por Moreno-Sánchez (1985) con algunas modificaciones. Una rata Wistar de 200-300 g se ayunó durante 24 horas, para agotar el glucógeno del hígado que sedimenta con las mitocondrias. El día del experimento, la rata permaneció una hora en el cuarto frío, para aumentar la degradación del glucógeno. La rata se sacrificó por golpe y dislocación cervical. Rápidamente el hígado se extrajo y se colocó en solución SHE (sacarosa 250 mM, Hepes 10 mM y EGTA 1 mM) a 4°C. Se trituró el tejido y lavó dos veces con la misma solución. Se cortó finamente con tijeras y se homogenizó con un vástago de teflón a razón de 15 bajadas lentas del vástago por medio hígado.

El homogenado se centrifugó durante 10 minutos a 2,500 rpm. El sobrenadante (sn) resultante se centrifugó a 9,000 rpm durante 10 minutos. La pastilla obtenida se resuspendió en el medio SHE con $MgCl_2$ 1 mM, ADP 1 mM y BSA (albúmina de suero bovino deslipidada) al 0.2% y se incubó durante 10 minutos a 4°C con agitación ocasional. Se llevó a volumen máximo (35ml) cada tubo con solución SHE y se centrifugó a 8,500 rpm durante 10 minutos. La pastilla resultante se resuspendió en 1 ml de medio SHE para dar una concentración de la proteína de 40-60 mg/ml. El rendimiento por medio hígado fue de 200-300 mg totales de proteína mitocondrial.

Determinación de la proteína mitocondrial.

Se realizó por el método de Biuret, utilizando albúmina bovina como estándar.

Medición del consumo de oxígeno.

La actividad de la cadena respiratoria se midió utilizando un oxímetro YSI-5300 con un electrodo tipo Clark. La cámara del oxímetro se adaptó a un baño de temperatura regulada a 34°C. Las mitocondrias se incubaron durante 7 minutos en presencia de Pi 2 mM, MgCl₂ 0.6 mM, succinato 5 mM, rotenona 1 μM y concentraciones crecientes de Ca²⁺ en el medio KME (KCl 120 mM, MOPS 25 mM y EGTA 1 mM). Al cabo de este tiempo se añadió ADP para registrar el estado 3 de la respiración. Para los experimentos de respiración desacoplada, se añadieron 100-500 pmoles de oligomicina a los 6 minutos y medio, seguidos de un exceso de ADP y a los 7 minutos se agregó 1.1 μl de CCCP 0.5 mM y se registró el consumo de oxígeno.

Amortiguadores de Ca²⁺/EGTA y Ca²⁺/HEDTA.

Para controlar las concentraciones de Ca²⁺ libre se utilizaron amortiguadores de Ca²⁺, según lo descrito por Moreno-Sánchez et al (1993). La concentración de Ca²⁺ libre con el amortiguador Ca²⁺/EGTA varió de 50 nM a 1 μM y con el amortiguador Ca²⁺/HEDTA varió de 50 nM a 2 μM.

Cuantificación de la síntesis de ATP.

La síntesis de ATP mitocondrial se cuantificó por un método radioactivo, utilizando ³²P. El método de extracción se realizó con molibdato de amonio y acetato de butilo en presencia de acetona. La radioactividad se midió como cuentas por minuto (cpm) y se expresó en nmoles de ATP/min/mg. Las mitocondrias (0.75 mg/ml) se incubaron en KME con succinato 5 mM, rotenona 1 μM, Pi 2 mM (³²P, 0.8-1.2 x 10⁶ cpm/ml) y MgCl₂ 0.6 mM a 34°C en un baño con agitación constante y con las concentraciones de Ca²⁺ indicadas en la sección de "Resultados y Discusión". A los 7 minutos se añadió un exceso de ADP. A los 2 minutos siguientes la reacción se detuvo con 200 μl de TCA (ácido tricloroacético) al

30% (p/v) y a 4°C. Se centrifugó durante 5 minutos a 2500 rpm. Se transfirió un ml del sobrenadante y se le agregó un ml de molibdato de amonio (5% / H₂SO₄ 5N). La mezcla se incubó por 2 minutos a 30°C. Se agitó en un vortex vigorosamente durante 30s. De las dos fases perfectamente distinguibles, se extrajo la fase superior. A la fase inferior acuosa se le agregaron 1 ml de acetato de butilo, 0.2 ml de acetona y 6 µl de Pi 1 M. Se incubó nuevamente a 30°C durante 2 minutos y se agitó vigorosamente y extrajo la fase superior. Este procedimiento fue repetido (ya sin Pi) hasta que las fases estuvieron completamente incoloras (4-5 extracciones por tubo). Se agregaron 5 ml de H₂O como medio ionizable para que la radiación β de alta energía se convierta en β de baja energía (tritio), con lo que ya no es necesario utilizar líquido de centelleo como señal amplificadora. Este efecto se conoce como radiación Cerenkov.

Determinación del potencial transmembranal con safranina.

La safranina es un catión lipofílico que se distribuye a través de la membrana, de acuerdo con la ecuación de Nernst. El empaquetamiento de este catión en la matriz mitocondrial provoca un cambio en la absorbancia, mismo que es registrado en un espectrofotómetro de doble longitud de onda a 554-520 nm (Akerman y Saris, 1976; Zanotti y Azzone, 1980). Se incubaron las mitocondrias en medio KME con safranina 5 µM y en las condiciones señaladas en la sección de "Resultados y Discusión".

Medición del potencial transmembranal con TPP*.

La diferencia de potencial eléctrico generado por la actividad de la cadena respiratoria se midió con tetrafenilfosfonio tritiado. Esta molécula se distribuye de acuerdo con la ecuación de Nernst. Entre mayor sea el potencial negativo interno generado, mayor será la incorporación del TPP* hacia el interior de la mitocondria. Las mitocondrias (1.5 mg/ml) se incubaron en 0.5 ml de KME con los substratos mencionados anteriormente

y 0.8 μM de $[^3\text{H}]\text{-TPP}^*$ (0.25mM=99,862 cpm/nmol). A los 7 minutos se añadió ADP en exceso. A los 2 minutos siguientes se detuvo la reacción centrifugando rápidamente a 14,000 rpm durante 1 minuto. Se tomaron 150 μl del sobrenadante y el resto se adsorbió con un cotonete. La pastilla se depositó en hielo. Las pastillas se solubilizaron con Tritón X-100 al 1% o SDS al 1%. Las pastillas solubilizadas y sus sobrenadantes respectivos se transfirieron a unos viales. Se les añadió 1 ml de etanol y se agregaron 5 ml de líquido de centelleo. Las muestras se leyeron en un contador de centelleo. Se aplicaron las correcciones de la ecuación de Nernst propuestas por Rottenberg (1984) para mitocondrias de hígado de rata. Esta ecuación toma en cuenta los coeficientes de partición del TPP^* a ambos lados de la membrana interna mitocondrial:

$$\Delta\Psi = 60.5 \log (R V_o - K_o' / V_i + K_i') ;$$

$V_o = 150\mu\text{l}$, $K_o' = 14.3$, $V_i = 1.5\text{ml}$, $K_i' = 9.7$ y $R = \text{cpm botón} / \text{cpm sn}$.

Medición de la arsenilación oxidativa.

El arsenato es un análogo estructural del fosfato. Este análogo entra a la mitocondria a través del acarreador de fosfatos. En ausencia de fosfato, la ATP sintetasa toma al arsenato y lo une al ADP endógeno creando el complejo ADP-arsenato. Este complejo se hidroliza espontáneamente en la matriz mitocondrial, creándose un ciclo de síntesis-hidrólisis, responsable del incremento en la respiración. Las mitocondrias se incubaron en presencia de succinato 5 mM, rotenona 1 μM y MgCl_2 0.6 mM, en presencia y ausencia de CAT (carboxiatractilósido) y/o Ca^{2+} /HEDTA, durante 6 minutos. A este tiempo se agregó 5 mM de arsenato \pm ADP. Se registró el consumo de oxígeno en las condiciones mencionadas con anterioridad.

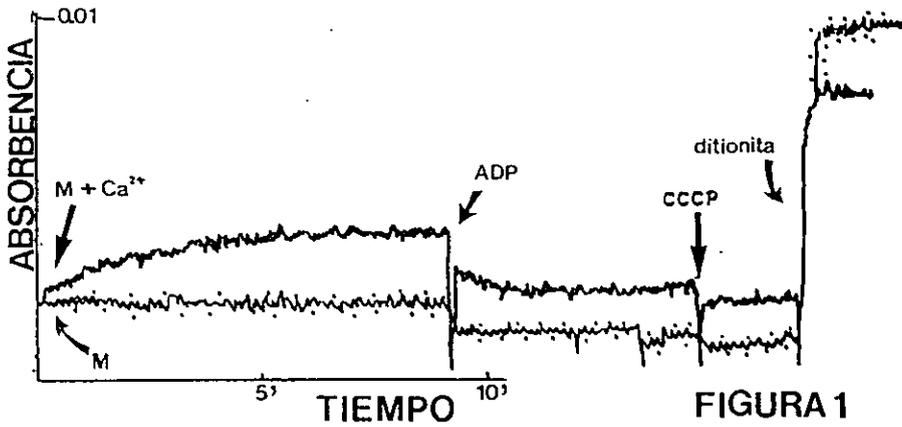
Método enzimático para la medición de ATP.

Este método se basa en que la hexocinasa fosforila a la glucosa en glucosa 6-fosfato con gasto de ATP. La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa convierte a la glucosa 6-fosfato en 6-fosfoglucono δ -lactona. Esta enzima requiere de NAD^+P . Así, por cada ATP consumido se produce un NADPH. Las mitocondrias se incubaron bajo las mismas condiciones que para la medición de la síntesis de ATP, excepto que se añadieron 100 μl de PCA al 30% (ácido perclórico) en vez de TCA. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación se neutralizó con la mezcla de tri-n-octilamina y triclorotrifluoroetano 1:1 (Khym, 1975). De esta mezcla, previa agitación en vortex, se obtuvieron 3 fases. Se tomó la fase acuosa superior y se congeló a -70°C . El día de la lectura, se descongelaron las muestras. Cada muestra se añadió a un medio compuesto por Hepes 0.1 M pH 8, 20 μl de glucosa 1 M, 20 μl de NAD^+P 20 mM, 8 μl de MgCl_2 1 M y 10 μl de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de Leuconostoc mesenteroides (2 mg/ml; >750 unidades de NAD/mg). La reacción se inició con 20 μl de hexocinasa (1mg/ml; 130-250 unidades/mg) en un espectrofotómetro de doble haz a 340 nm, para seguir la formación de NADPH. Cada curva fue calibrada con ATP externo. Utilizando el coeficiente de extinción del NADH, 6.22 M^{-1} , se calculó el ATP en nmoles/min/mg.

Actividad del citocromo bc1.

La actividad del complejo III mitocondrial se determinó como porcentaje de reducción de éste, en presencia de succinato y de substratos artificiales donadores del bc_1 , tanto en estado 4 como en estado 3 de la respiración. Las mitocondrias fueron incubadas en medio KME con el substrato indicado, Pi 2 mM, Mg 0.6 mM y rot 1 μM , con concentraciones crecientes de Ca/HEDTA. A los 7 minutos se añadió ADP. Se obtuvo el mínimo de reducción al añadir 4 μl de CCP 0.5 mM. El máximo fue obtenido

en presencia de antimicina y ditionita. La reducción del citocromo b fue medida a 34°C utilizando un espectrofotómetro de doble haz a 560-575 nm de longitud de onda, registrando la absorbancia en función del tiempo, tal como se muestra en la Fig. 1.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de la temperatura y tiempo de preincubación sobre la respiración mitocondrial.

Durante el aislamiento de las mitocondrias, éstas son expuestas a altas concentraciones de Ca^{2+} (Lötscher *et al.*, 1980) por tanto, es necesario preincubarlas durante ciertos minutos para disminuir su concentración a niveles fisiológicos (5-20 nmoles/mg proteína mitocondrial). El tiempo de preincubación sobre la velocidad de respiración está influenciado por la temperatura. En 1991, Moreno-Sánchez y Torres-Márquez reportaron una temperatura de 34°C para obtener el óptimo de estimulación por Ca^{2+} sobre el estado 3 de la respiración mitocondrial. Esto fue corroborado en el laboratorio por Mónica Carmona en 1993.

Esta alta concentración de Ca^{2+} endógeno impidió que, por ejemplo, en mitocondrias aisladas de placenta humana, con succinato, no se observara estimulación por Ca^{2+} (0⇌1 μM) sobre el estado 3 de la respiración mitocondrial (Garduño *et al.*, 1992). Las mitocondrias de placenta humana tienen un alto contenido de Ca^{2+} (Martínez *et al.*, 1987) por lo que podría ser que tanto el tiempo de preincubación (5 minutos) como la temperatura (25°C) hayan sido insuficientes para depletar el Ca^{2+} endógeno. Para mitocondrias de hígado de rata se ha establecido (Moreno-Sánchez y Torres-Márquez, 1991) un tiempo de preincubación de 7 minutos y una temperatura de 34°C para observar una máxima estimulación por Ca^{2+} .

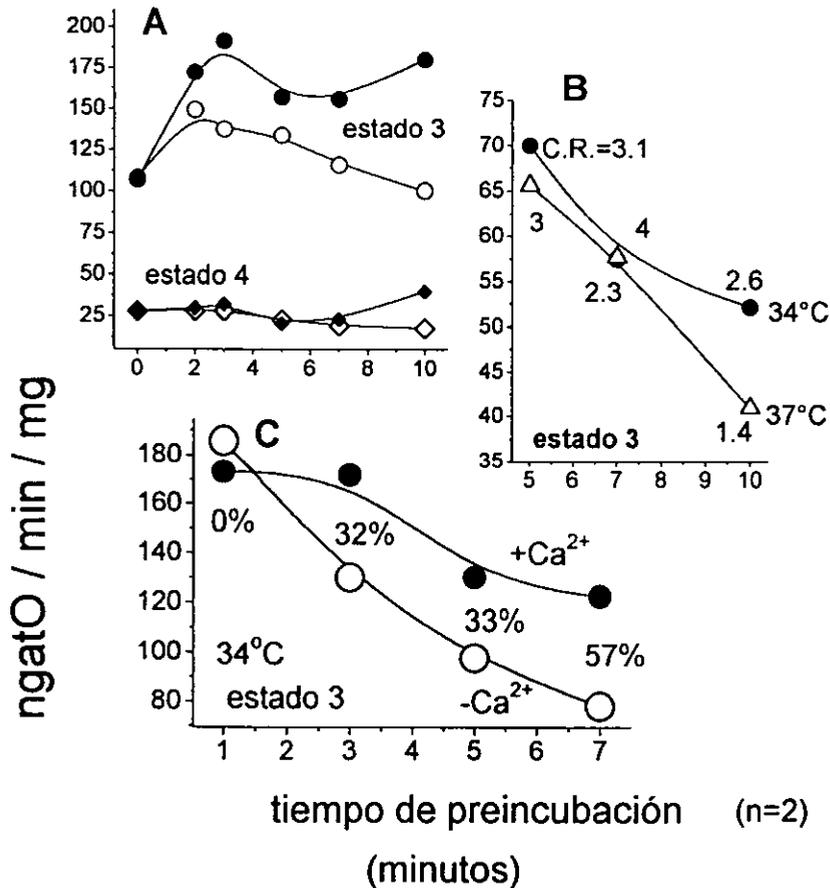


Figura 2. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE PREINCUBACIÓN EN LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

Las mitocondrias (1mg/ml) fueron incubadas en KME, succinato 5mM, rotenona 1 μ M, Pi 2mM, Mg²⁺ 0.6mM \pm 0.3 μ M de Ca²⁺ durante el tiempo y la temperatura indicados. El ADP se añadió a los minutos indicados, registrándose el consumo de oxígeno en el estado 3. A) 34°C, círculos, sin Ca²⁺, puntos, Ca²⁺ B) a 34 y 37°C. Se indica el control respiratorio. C) Se indican la estimulación máxima del Ca²⁺, en porcentaje.

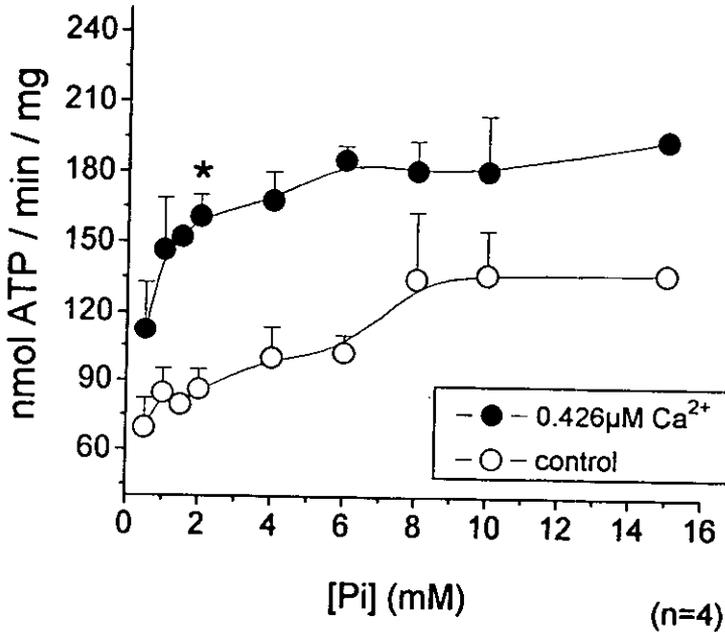
La velocidad de consumo de oxígeno disminuyó conforme se aumentó el tiempo de preincubación (Fig.2B) tanto a 34 como a 37°C con cierto desacoplamiento hacia los 10 minutos (estado 4, Fig.2A). En presencia de Ca^{2+} , la disminución de la velocidad es menor, encontrándose una estimulación mayor (57%) a los 7 minutos de preincubación, corroborando lo reportado por Moreno-Sánchez (1985) quien encontró una estimulación del Ca^{2+} del 38.6% cuando las mitocondrias se preincubaron durante 7 minutos.

Al realizar las curvas en presencia de Ca^{2+} a 37°C, sólo era necesario preincubar durante 5 minutos; sin embargo, a esta temperatura las mitocondrias se volvían lábiles, por lo que un ligero aumento en la concentración de Ca^{2+} las desacoplaba. Al disminuir la temperatura de 37°C a 30°C la estimulación en presencia de succinato disminuyó considerablemente (16.4%), contrario a lo reportado por Moreno-Sánchez (1985), que a 30°C observó una estimulación del 83% con este sustrato. A 37°C, Johnston y Brand (1987) no encontraron efecto del Ca^{2+} (0.75→820 nM) con ninguna de las concentraciones de succinato empleadas. Panov y Scaduto (1996) tampoco encontraron estimulación por Ca^{2+} de la respiración en estado 3 ni en el $\Delta\Psi$ en presencia de 5 mM de succinato.

Por tanto, la temperatura y tiempo de preincubación donde se encontró un efecto óptimo del Ca^{2+} sobre el consumo de oxígeno fueron 34°C y 7 minutos de preincubación.

Efecto del fosfato.

Uno de los metabolitos involucrados en el sistema fosforilante es el fosfato. Este metabolito interactúa con dos de las enzimas de este sistema; el acarreador de fosfatos y la ATP sintetasa. La entrada de fosfato (H_2PO_4^-) en intercambio con OH^- o en cotransporte con protón, colapsa el ΔpH , transduciéndose en un incremento en el $\Delta\Psi$. La K_m para el fosfato en mitocondrias de hígado es de 1-2 mM. Se evaluó el efecto del incremento



* Pi 2mM, $p < 0.0025$

Figura 3. -Efecto del fosfato sobre la estimulación de la fosforilación oxidativa por Ca²⁺

Las mitocondrias se preincubaron a 34°C durante 7 minutos en KME, Succinato 5 mM, rotenona 1 μM, Mg²⁺ 0.6 mM, en presencia y ausencia de Ca²⁺. Se agregó ADP a los 7 minutos. A los 9 minutos la reacción se detuvo con 200 μl de TCA al 30%. Se cuantificó la síntesis de ATP por el método radioactivo.

en fosfato sobre la síntesis de ATP mitocondrial tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} . La concentración de Ca^{2+} utilizada ($0.426 \mu\text{M}$) fue con la cual había una estimulación máxima del consumo de oxígeno.

Se observó una estimulación de la síntesis de ATP al aumentar la concentración de P_i de 0.5 mM (70 nmoles/min/mg) a 8 mM ($135 \text{ nmoles/min/mg}$) (círculos, Fig.3). Se dió también un aumento en la síntesis de ATP, en presencia de Ca^{2+} de 110 nmoles hasta $180 \text{ nmoles ATP/min/mg}$ cuando se incrementó la concentración de P_i de 0.5 mM hasta 8 mM (puntos, Fig.3). Aún con la enzima completamente saturada (círculos, a partir de P_i 8 mM), el efecto estimulador del Ca^{2+} fue observable. Ya que este acarreador es el más rápido en las mitocondrias de hígado (Coty y Pedersen, 1975), además de estar en mayor concentración que la mayoría de las enzimas mitocondriales (Fonyo y Vignais, 1980), nos permite sugerir que el efecto del Ca^{2+} sobre la fosforilación oxidativa no es a nivel del acarreador de fosfatos. Si existe estimulación a nivel del sistema fosforilante, entonces las otras dos enzimas quedan como los probables blancos del Ca^{2+} .

Efecto del Mg^{2+} .

El Mg^{2+} es un inhibidor competitivo de la entrada de Ca^{2+} (Akerman y Nicholls, 1983; Crompton, 1985). Con el uso de indicadores fluorescentes y NMR se ha demostrado que la concentración de Mg^{2+} citosólica varía en un intervalo de $0.3\text{-}0.8 \text{ mM}$ (Corkey *et al.*, 1986; Jung y Brierley, 1986). Para que una enzima pueda ser reguladora, alguno de los metabolitos involucrados con su actividad debe variar al existir un estímulo. Con el advenimiento de nuevas técnicas, se ha establecido que el Mg^{2+} presenta variaciones dependientes de algún estímulo fisiológico y, es probable, que las enzimas cuya actividad dependa de Mg^{2+} puedan ser enzimas reguladoras. De hecho, se ha observado una estimulación de la síntesis de ATP por Mg^{2+} ($K_{05}=0.13 \text{ mM}$) (Moreno-Sánchez *et al.*, 1997) en mitocondrias

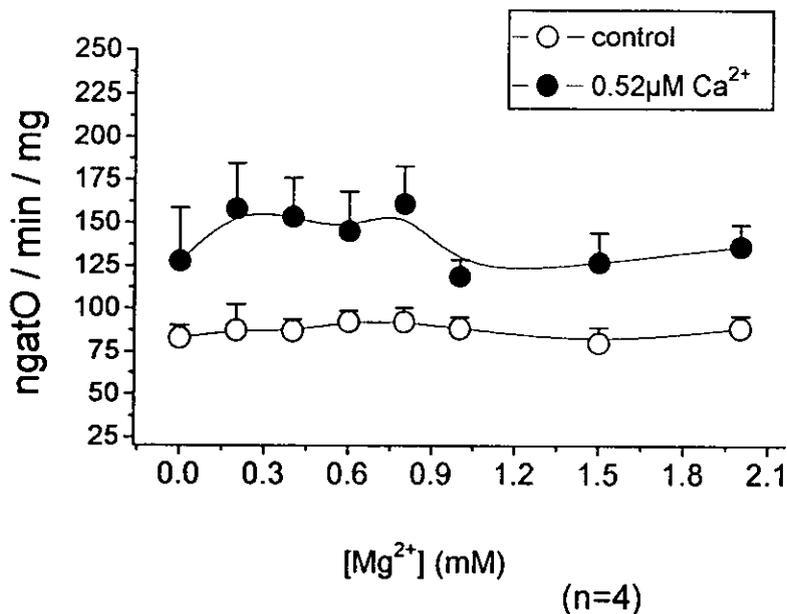


Figura 4. Efecto del Mg²⁺ sobre la fosforilación oxidativa en presencia y ausencia de Ca²⁺.

Las mitocondrias se preincubaron a 34°C durante 7 minutos en KME, succinato 5 mM, Pi 2 mM, rotenona 1 μM y concentraciones crecientes de Mg²⁺. Se registró el consumo de oxígeno en estado 3 al añadir ADP.

de corazón de rata. En estas mitocondrias, la estimulación de la fosforilación oxidativa se debe a la activación de la 2-OGDH por el Mg^{2+} .

El verdadero sustrato de la ATP sintetasa es el Mg-ADP (Kozlov y Skulachev, 1977) y el sustrato del translocador de nucleótidos de adenina es el ADP libre. Cabe esperar que un incremento en la concentración del Mg^{2+} promueva una activación de la ATP sintetasa mientras que la disponibilidad de ADP disminuya, haciendo limitante al translocador.

En las mitocondrias de hígado de rata no se observó estimulación del consumo de oxígeno en estado 3 al variar la concentración del Mg^{2+} de 0 a 2 mM (círculos, Fig.4) ni en presencia de una concentración estimulante de Ca^{2+} (puntos, Fig.4). La estimulación de la respiración por el Ca^{2+} es independiente de la concentración del Mg^{2+} , hasta 2 mM (Fig.4). En nuestro sistema se excluye a la 2-OGDH y, por tanto, el probable efecto del Mg^{2+} sobre la síntesis de ATP; sin embargo sería conveniente determinar si existen variaciones del Mg^{2+} en el hígado, como se ha observado para el corazón. En mitocondrias de hígado de rata, es importante señalar que los blancos potenciales del Ca^{2+} son selectivos para éste y no para otro catión divalente como el Mg^{2+} (Figura 4).

Efecto de la espermina.

La espermina es una poliamina que a bajas concentraciones actúa como activador de la entrada de Ca^{2+} (Nicchitta y Williamson, 1984). Evaluamos el efecto de la espermina sobre la curva de estimulación por Ca^{2+} (Fig. 5). Se observó un desplazamiento de la curva de estimulación hacia la izquierda, indicando que con concentraciones menores de Ca^{2+} , se alcanzaba la máxima estimulación, en presencia de 0.5 mM de espermina. El efecto de la espermina sobre la respiración en el estado 3, fue observado por Murphy *et al.* (1990) en mitocondrias de hígado preincubadas con Ca^{2+} .

La modulación del transporte de Ca^{2+} hacia el interior de la matriz mitocondrial por espermina es una evidencia indirecta de que el Ca^{2+}

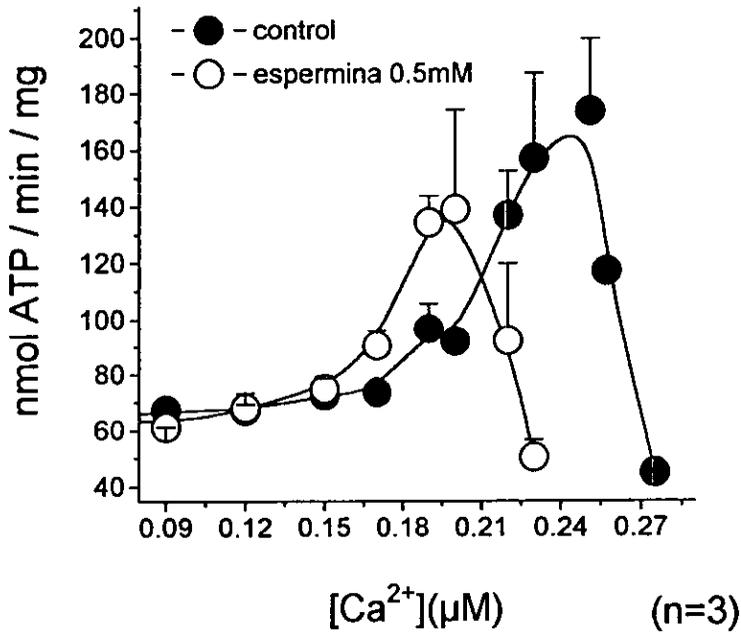


Figura 5. Efecto de la espermina sobre la estimulación de la fosforilación oxidativa por Ca²⁺.

Figura 5. Se preincubaron las mitocondrias durante 7 minutos a 34°C en KME, succinato 5 mM, rotenona 1 µM, MgCl₂ 0.6 mM y Pi 2 mM, en presencia de espermina 0.5 mM. Se determinó la síntesis de ATP por el método radioactivo.

intramitocondrial es el que ejerce la estimulación sobre la fosforilación oxidativa.

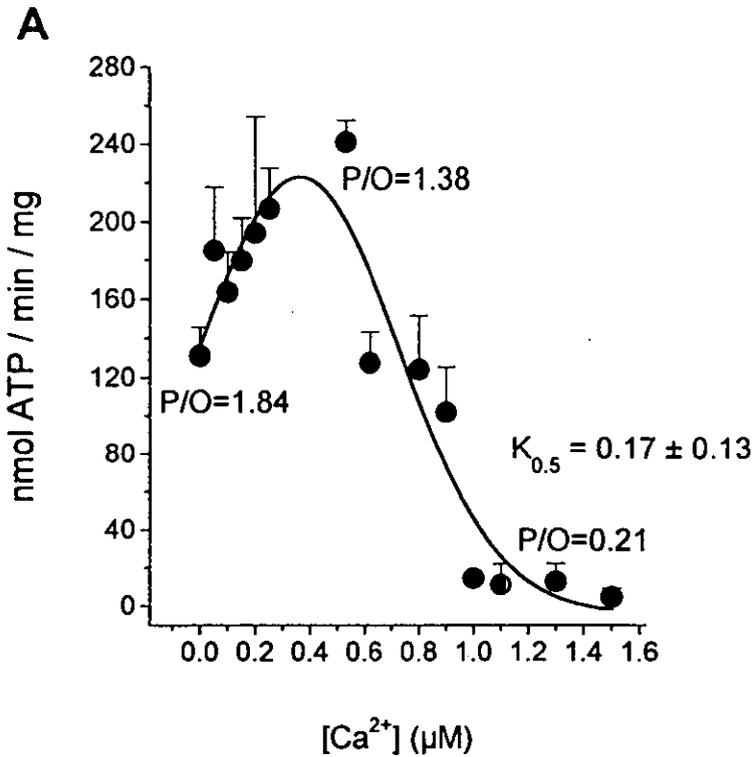
Estimulación de la fosforilación oxidativa por Ca^{2+} .

Las mitocondrias de hígado de rata sintetizaron 130 nmoles de ATP/min/mg aproximadamente. En presencia de $0.25 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} , la síntesis de ATP aumentó hasta 206.8 nmoles (Figura 6A). El Ca^{2+} estimuló un 57% la fosforilación oxidativa en presencia de succinato, con una $K_{0.5}$ de $0.17 \mu\text{M}$. Este resultado corrobora el obtenido por Moreno-Sánchez (1985) a 30°C en el cual se dió una estimulación de la síntesis de ATP con succinato, de aproximadamente 70.7% en las mitocondrias preincubadas por 5 minutos. La estimulación del Ca^{2+} sobre el estado 3 de la respiración con succinato 5 mM, sin que existiera cambio en el estado 4, y sobre la síntesis de ATP presentó un máximo con $1 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} mientras que con $5 \mu\text{M}$ se daba un efecto inhibitorio. En nuestras condiciones, se dió una sensibilidad mayor por el Ca^{2+} ya que el efecto desacoplante e inhibitorio se observó a partir de $0.4 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} . Las diferencias observadas pueden deberse al tiempo de preincubación y la temperatura utilizados en cada diseño experimental.

Una de las evidencias de que el Ca^{2+} puede estimular a la fosforilación oxidativa al activar enzimas que no son las DHs, es la de observar activación de la síntesis de ATP por Ca^{2+} cuando el sustrato es succinato. Otra de las evidencias la observaron Moreno-Sánchez *et al.*, (1990,1991), al graficar el porcentaje de reducción del $\text{NAD}^+(\text{P})\text{H}$ contra el porcentaje de la respiración en estado 3, en mitocondrias de corazón de rata. Los autores observaron que la curva en presencia de Ca^{2+} se desplazaba hacia la izquierda de la curva que tenía diferentes concentraciones de 2-OG. El porcentaje de activación del Ca^{2+} sobre el consumo de oxígeno en todos los casos probados fue mayor que el porcentaje de reducción del $\text{NAD}^+(\text{P})\text{H}$, lo cual indica que, además de las DHs, se están activando otras enzimas. Con base en los resultados

observados (Moreno-Sánchez *et al.*, 1990; Moreno-Sánchez *et al.*, 1991), los autores sugirieron que el Ca^{2+} además de estimular a las DHs, estimulaba a otros niveles, como son las enzimas de la cadena respiratoria y/o las enzimas del sistema fosforilante. Contrario a lo encontrado por Moreno-Sánchez (1990,1991), Panov y Scaduto (1996) reportaron que el aumento en el % de estimulación del $\text{NAD}^+(\text{P})\text{H}$ por Ca^{2+} no correspondía con un incremento en el consumo de oxígeno en estado 3. Asimismo, sólo se observó una activación por Ca^{2+} del $\Delta\psi$ en presencia de ADP; es decir, que sólo en condiciones de estado 3 de la respiración el Ca^{2+} ejerce una activación sobre la fosforilación oxidativa. El aumento en la concentración de sustrato provocó una estimulación de la respiración en presencia de ADP. La respiración mitocondrial en corazón fue altamente dependiente de ADP y Ca^{2+} . La mayor estimulación fue observada con glutamato. No hubo efecto del Ca^{2+} sobre la reducción del $\text{NAD}^+(\text{P})$, el $\Delta\psi$ o la respiración con 2-OG 10 mM, que es una concentración saturante, por lo que se concluyó que el efecto del Ca^{2+} era a nivel de la 2-OG deshidrogenasa exclusivamente. Las diferencias entre el trabajo de Moreno-Sánchez *et al.* (1990,1991) y Panov y Scaduto (1996) pueden deberse a los diseños experimentales; ya que los experimentos con ADP, de Panov y Scaduto (1996), involucraron el sistema regenerante de glucosa-hexocinasa ($\pm 1 \mu\text{M Ca}^{2+}$) mientras que Moreno-Sánchez *et al.* (1990,1991) utilizó una misma concentración de ADP con concentraciones crecientes de Ca^{2+} . A la misma concentración de 2-OG 10 mM, (100% de respiración en estado 3) se observó un 37% (Moreno-Sánchez *et al.*, 1990) y 72% (Panov y Scaduto, 1996) de reducción de piridín nucleótidos.

El efecto activador del Ca^{2+} sobre la fosforilación oxidativa se ha observado en mitocondrias de hígado de rata. La evidencia en corazón no ha sido contundente. Las diferencias observadas pueden deberse al metabolismo energético de cada órgano; las mitocondrias de hígado, en presencia de succinato, consumen oxígeno a velocidades menores (60-100



% estimulación 57 ± 24
(n = 13)

Figura 6. Estimulación de la síntesis de ATP por Ca^{2+}

Las mitocondrias se incubaron como se describió en la Figura 5, en presencia de hexocinasa, glucosa 10 mM y $^{32}P_i$. A los dos minutos de fosforilación, se detuvo la reacción con 200 μl de TCA al 30%. Se centrifugó durante 5 minutos a 2500 rpm. El sobrenadante se transfirió y procesó para la extracción, como se describió en la sección de la "Metodología".

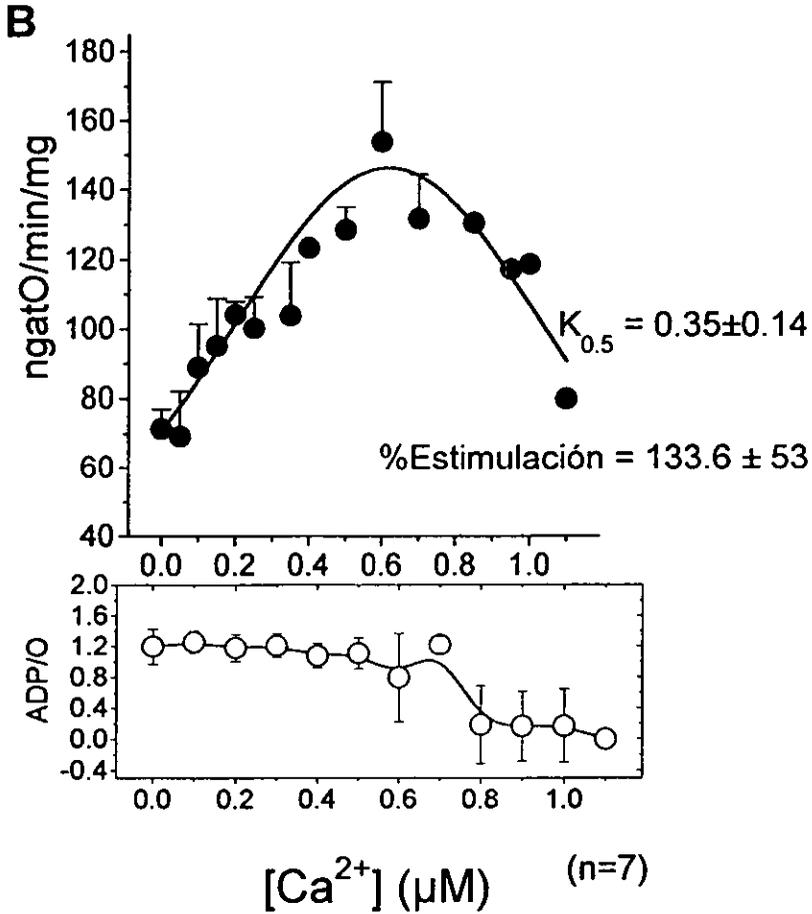


Figura 6. ESTIMULACIÓN DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL POR Ca^{2+}

Las mitocondrias se incubaron como se describen en la Figura 5. A los 7 minutos de incubación se agregaron 300-500 nmoles ADP para iniciar el estado 3 de la respiración. Se siguió el registro hasta el regreso al estado 4 de la respiración. Se calibró con ditionita al final de cada trazo. La relación ADP/O se obtuvo al dividir los nmoles de ADP añadidos entre los ngátomos de oxígeno consumidos durante el estado 3.

ngatO / min / mg) que las de corazón (300-500 ngatO/min/mg). La concentración de la F_1 ATPasa es menor en el hígado (0.12 $\mu\text{mol/mg}$ proteína) que en el corazón (0.27 $\mu\text{mol/mg}$ proteína) (Bertina *et al.*, 1973). La concentración del translocador también es menor en el hígado (0.2-0.3 $\mu\text{mol/g}$ proteína) que en el corazón (1-1.2 $\mu\text{mol/g}$ proteína) (Block *et al.*, 1980). Esto implica que la proporción del translocador/ F_1 ATPasa es menor en el hígado (2) que en el corazón (4.5); en las mitocondrias del hígado de rata, el control recae principalmente en el translocador de ATP/ADP y el transporte de sustratos mientras que en las mitocondrias del corazón, el control recae sobre la ATP sintetasa y el complejo I, lo cual explica la reciprocidad observada (Moreno-Sánchez, 1985) en los coeficientes de control de ambas enzimas en presencia de Ca^{2+} .

Las mitocondrias de hígado de rata, con succinato, mostraron una velocidad de consumo de oxígeno en estado 3 de 70 ngatO/min/mg en la ausencia de Ca^{2+} y de 149 ngatO/min/mg con 0.6 μM de Ca^{2+} libre (Fig. 6B). Al obtener la relación P/O (Tabla I), es decir, las nmoles de ATP sintetizado por oxígeno consumido, la P/O del control (1.84) disminuyó a 1.38 en la condición de máxima estimulación. Con concentraciones cercanas al 1 μM de Ca^{2+} la P/O disminuyó drásticamente hasta 0.22. Las relaciones P/O para la estimulación de la fosforilación oxidativa por el Ca^{2+} se muestran en la Tabla I.

La P/O disminuyó drásticamente debido a que las curvas de síntesis de ATP y respiración en estado 3 muestran $K_{0.5}$ diferentes. La sensibilidad por Ca^{2+} es mayor en cuanto a la síntesis que a la respiración. Hacia el punto óptimo de la curva de respiración, la activación es igual que el desacoplamiento e inhibición. Esto se comprueba con la relación ADP/O, que disminuye a partir del punto máximo de estimulación (0.6→0.8 μM de Ca^{2+} ; Fig.6B). En cambio, al medir la síntesis de ATP directamente, sólo se está registrando el efecto activador del Ca^{2+} y el desacoplamiento e inhibición se registra como la disminución en la eficiencia del sistema, es

TABLA I. Efecto del Ca^{2+} sobre la relación P/O en las mitocondrias del hígado de rata.

[Ca^{2+} /HEDTA] (μM)	P/O
0.00-0.02	1.84 \pm 0.81
0.05-0.10	2.10 \pm 1.06
0.11-0.20	2.11 \pm 1.12
0.21-0.30	1.82 \pm 0.71
0.31-0.40	1.36 \pm 0.84
0.41-0.50	0.95 \pm 0.94
0.51-0.60	0.77 \pm 0.46
0.71-0.80	0.53 \pm 0.49
0.81-0.90	0.55 \pm 0.50
0.90-1.10	0.22 \pm 0.17

Las relaciones P/O se calcularon al dividir las nanomoles de ATP obtenidas de los experimentos de síntesis de AT^{32}P entre los $\text{ngatO}/\text{min}/\text{mg}$ obtenidos de los experimentos de la respiración en el estado 3, por oximetría. Para la división, las concentraciones de Ca^{2+} fueron agrupadas en intervalos, como se muestra en la Tabla I.

decir una disminución en los nmoles de ATP sintetizado. A partir de $0.4 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} , la P/O disminuye drásticamente mostrando que al efecto de desacoplamiento se une la inhibición de la vía por daño mitocondrial. Esta inhibición por concentraciones mayores de Ca^{2+} fue observada por Moreno-Sánchez (1985) para mitocondrias de hígado.

Bajo condiciones de 100% del estado 3 de la respiración, a 34°C , con una concentración de Mg^{2+} 0.6 mM , Pi 2 mM y rotenona $1-2 \mu\text{M}$ y utilizando una concentración saturante de sustrato como la de succinato 5 mM , se observó una estimulación del Ca^{2+} sobre el consumo de oxígeno así como de la síntesis de ATP. Este resultado implica que, además de las 3 deshidrogenasas sensibles a Ca^{2+} , dentro de la fosforilación oxidativa existen otras enzimas susceptibles a ser estimuladas por este catión.

Donadores artificiales.

Los resultados anteriores demostraron claramente que existe una estimulación del Ca^{2+} sobre la fosforilación oxidativa. Esta estimulación es independiente de la activación de las deshidrogenasas. En trabajos previos se ha observado que la succinato deshidrogenasa no es sensible al Ca^{2+} (Murphy *et al.*, 1988). Los coeficientes de control de flujo (Co) de la ATP sintetasa y la translocasa de ATP/ADP en las mitocondrias de hígado de rata varían alrededor de 0.1-0.3. Compartiendo estas dos enzimas la mayoría del control sobre la vía, cabría esperar que fueran susceptibles a la activación por Ca^{2+} . Evaluamos el efecto de otros sustratos sobre nuestro sistema para lograr reproducir la estimulación del Ca^{2+} sin la participación de las deshidrogenasas, y para descartar a la succinato deshidrogenasa (utilizando quinonas) y al Complejo III (utilizando TMPD).

En presencia de antimicina, un inhibidor del Complejo III mitocondrial, y de ascorbato como reductor, tanto el PMS (metasulfato de fenazina) como el TMPD (tetrametil-p-fenilenediamina) donan sus electrones a la citocromo oxidasa. En presencia de la rotenona, un inhibidor

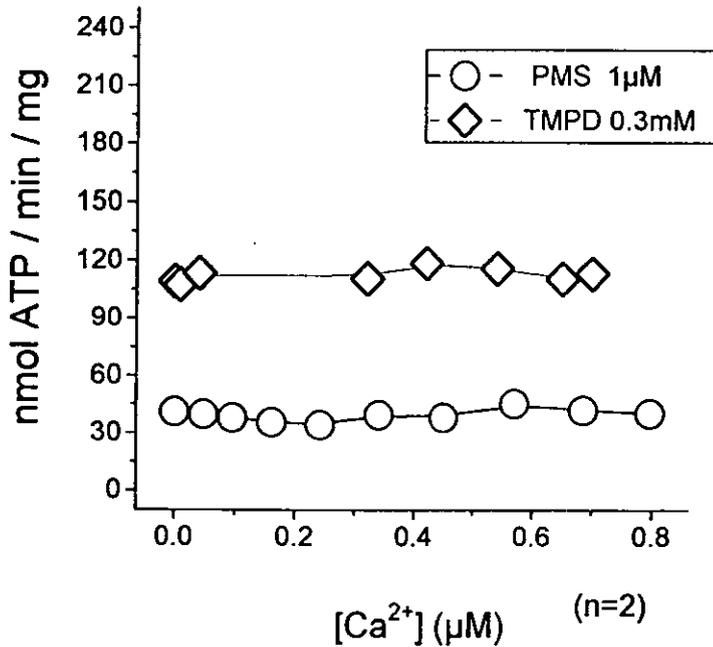


Figura 7. Efecto del Ca^{2+} sobre la síntesis de AT^{32}P utilizando sustratos artificiales

Las mitocondrias se incubaron como en la Figura 6A, excepto por el sustrato. Para el PMS y TMPD se utilizó ascorbato 5 mM como agente reductor. Las incubaciones se hicieron en presencia de antimicina 2 µM.

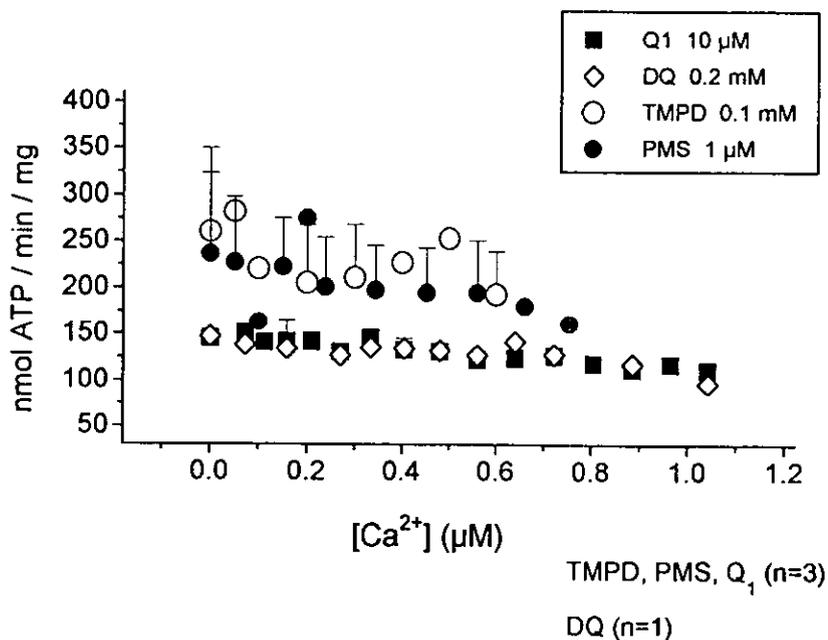


Figura 8A. Efecto del Ca^{2+} sobre la síntesis de ATP en presencia de sustratos artificiales

Las mitocondrias se incubaron en el medio KME durante 7 minutos a 34°C . Se añadió un exceso de ADP. A los 9 minutos la reacción se detuvo con $100\ \mu\text{l}$ de PCA al 30%. Se neutralizó con octilamina y triclorotrifluoroetano 1:1. Se determinó el ATP sintetizado por método enzimático.

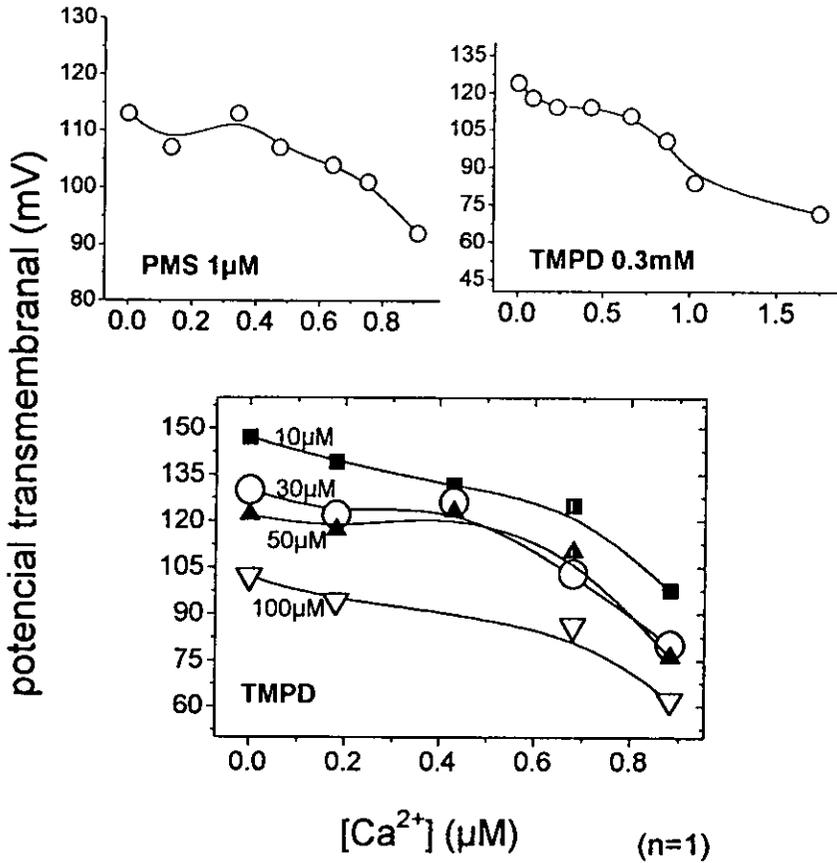


Figura 8B. EFECTO DEL Ca^{2+} SOBRE LA DIFERENCIA EN EL POTENCIAL TRANSMEMBRANAL EN PRESENCIA DE SUSTRATOS ARTIFICIALES

Las mitocondrias (1.5 mg/ml) se incubaron en KME con Pi 2 mM, Mg 0.6 mM, ascorbato 5 mM, antimicina 2 μM , y [3H]-TPP 0.8 μM a 34°C durante 7 minutos. Se agregó un exceso de ADP. La reacción se detuvo por ultracentrifugación, como se explica en la sección de la "Metodología".

del Sitio 1 de la cadena respiratoria, y del DTT (ditiotrietol) como agente reductor, tanto la quinona 1 (Q_1) como la duroquinona (dq) donan sus electrones al bc_1 .

Se evaluó el efecto de estos sustratos sobre la síntesis de ATP. No se observó estimulación por Ca^{2+} de la síntesis de ATP en presencia de PMS o TMPD (Fig.7) ni con los análogos de la quinona. En la síntesis de ATP por método enzimático, los valores de ATP fueron mayores (Fig.8A) que por el método radioactivo (Fig.7). Las P/O obtenidas con el método enzimático (e) son mayores que con el método radioactivo (r); con TMPD 0.3 mM se obtuvo una P/O(e) de 2.13 y P/O (r) de 0.71; para PMS 1 μ M, la P/O (e) fue de 2.58 y P/O (r) de 0.37. La P/O teórica al utilizar sustratos para la citocromo oxidasa es de 1. Los valores que se acercaron más a este número fueron obtenidos por el método radioactivo. Las P/O(e) para Q_1 y dq fueron 3.7 y 2.72 respectivamente, valores nuevamente altos, ya que la P/O esperada es de 2. Con base en estos valores se concluyó que el método más confiable para la medición del ATP sintetizado es el del $^{32}P_i$. Las diferencias en ambos métodos pueden deberse a que en el método radioactivo, el número de lavadas aumenta cuando se emplean DTT o ascorbato ya que estos reductores interactúan con el molibdato de amonio; entonces, parte del ATP sintetizado se está perdiendo en las lavadas.

La síntesis de ATP se mantuvo constante tanto con PMS como con TMPD (Fig.7). No existe una estimulación por el Ca^{2+} , pero tampoco se observa inhibición, lo cual lleva a la conclusión de que la citocromo oxidasa no es blanco del Ca^{2+} . La conclusión sería igual para los 2 análogos de quinonas (Fig. 8A); en este caso, se está descartando tanto la citocromo oxidasa como el citocromo bc_1 . El Ca^{2+} en presencia de los donadores artificiales no estimuló; bajo el método enzimático, se observó inhibición predominantemente con el PMS y TMPD (Fig.8A). Tal inhibición fue debida al efecto desacoplante que mostraron aún a bajas concentraciones de éstos y en presencia de Ca^{2+} (Fig.8B). Las curvas de la figura muestran el efecto

del Ca^{2+} sobre el potencial transmembranal, en presencia de PMS o TMPD. Con PMS 1 μM , el $\Delta\Psi$ disminuye al aumentar la concentración de Ca^{2+} . A esta concentración, la velocidad de consumo de oxígeno es igual que la obtenida con succinato 5 mM, sin embargo el potencial disminuye de 127 mV (succinato) a 113 mV (PMS). Utilizando TMPD 0.3 mM se observó una disminución en el potencial en presencia de Ca^{2+} . Aún a concentraciones menores de TMPD, se observa un desacoplamiento, ya que, sin añadir Ca^{2+} (gráfica 3, Fig.8B), al incrementar la concentración del sustrato, el potencial transmembranal disminuye. Con TMPD 0.1 mM, Murphy *et al.* (1990) no observaron estimulación del consumo de oxígeno por el Ca^{2+} . Sin embargo, con durohidroquinona obtuvieron 92% de estimulación y con succinato, 152%; lo cual les llevó a concluir que el bc₁ era el blanco del Ca^{2+} . Los resultados con TMPD descartan como blanco a la citocromo oxidasa e implican que sólo en presencia del bc₁ se observa estimulación. Sin embargo, los resultados con quinonas descartan al Sitio 2. El tratamiento empleando con quinonas y durohidroquinona fue diferente. Las moléculas entre sí son diferentes ya que la durohidroquinona ya está reducida y no necesita del DTT como agente reductor. Sin embargo, con las quinonas se observó una estimulación por el Ca^{2+} del porcentaje de reducción del citocromo b, componente del citocromo bc₁ (Figura 12).

Acarreador de dicarboxilatos y Complejo I.

Si la succinato deshidrogenasa no es sensible al Ca^{2+} (Murphy *et al.*, 1988), el único candidato restante del sistema oxidativo es el transportador de dicarboxílicos. En las mitocondrias del hígado de rata, con succinato, este transportador tiene un alto coeficiente de control del flujo, de 0.33 (Groen *et al.*, 1982b; Kunz *et al.*, 1988). Sin embargo Moreno-Sánchez (1985b) reportó un Co de 0.08 para esta enzima. Las discrepancias en los resultados han sido interpretadas en términos del diseño experimental (Moreno-Sánchez y Torres-Márquez, 1991). El tener un alto Co y no

observar efecto con quinonas o TMPD, abre la posibilidad de que esta enzima ejerza 33% del control sobre la vía, y al activarse, inducir una estimulación de la fosforilación oxidativa.

Los experimentos de Panov y Scaduto (1995) mostraron que con las concentraciones de Ca^{2+} para la estimulación de las deshidrogenasas dependientes de NAD^+ , no existe una activación del Complejo I en partículas submitocondriales de corazón de rata. En las mitocondrias intactas, el NADH no permea, y al utilizar rotenona como inhibidor del Sitio 1, se impide evaluar el efecto del Ca^{2+} sobre esta enzima. Al emplear glutamato-malato como sustratos, se involucra la participación del Complejo I, pero no puede discriminarse que la activación sea a ese nivel o sobre la 2-OGDH; de ahí el uso de partículas submitocondriales o mitocondrias permeabilizadas.

Efecto del Ca^{2+} sobre el $\Delta\Psi$.

La activación de la fosforilación oxidativa por el Ca^{2+} , en presencia de succinato, puede deberse a la estimulación sobre el sistema oxidativo y/o el fosforilante. Una estimulación a nivel del sistema respiratorio traería como consecuencia un aumento en la velocidad de la cadena transportadora de electrones y en consecuencia, un incremento en el bombeo de protones. Como producto de la actividad de la cadena respiratoria el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) aumentaría. Este gradiente puede medirse a nivel de uno de sus dos componentes: el $\Delta\Psi$, que en mitocondrias es el componente principal del gradiente electroquímico (Nicholls y Ferguson, 1992).

Asimismo, una estimulación a nivel del sistema fosforilante se traduciría como una disminución en su sustrato, es decir, en el gradiente. Una estimulación de la misma magnitud sobre los dos sistemas, daría un efecto nulo sobre el gradiente electroquímico.

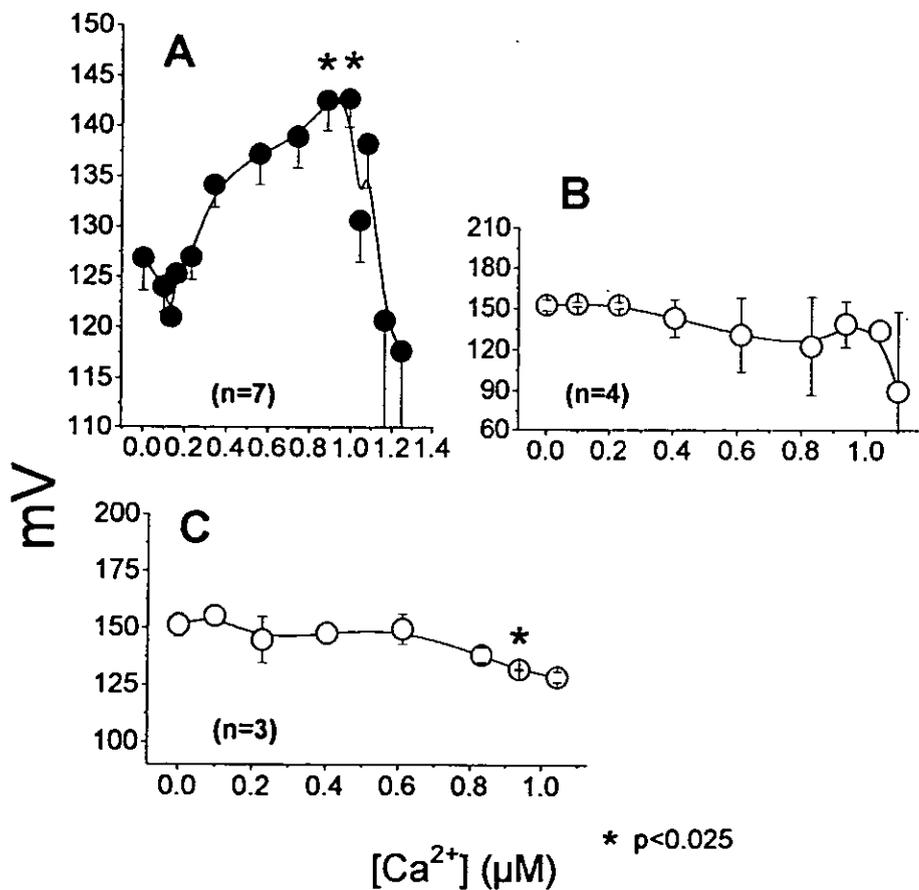


Figura 9. EFECTO DEL Ca²⁺ SOBRE LA DIFERENCIA DEL POTENCIAL TRANSMEMBRANAL

Las mitocondrias de hígado de rata (1.5 mg/ml) se incubaron en 0.5ml del medio KME con succinato 5 mM, MgCl₂ 0.6 mM, Pi 2 mM,

rotenona 1 µM y la concentración de Ca²⁺ indicada, durante 7 minutos a 34°C, como se indica en la sección de la "Metodología".

A) estado 3; B) estado 4 a 34°C y C) estado 4 a 20°C.

En presencia de ADP, el Ca^{2+} provocó un aumento en el gradiente electroquímico, medido como $\Delta\Psi$ (Fig.9A). La concentración de Ca^{2+} libre para la estimulación del potencial transmembranal varió alrededor de 0.85 μM . En este intervalo (0.8-0.9 μM de Ca^{2+}), se dió un incremento significativo en relación con el control ($p < 0.025$) del 10% (14 mV) del potencial transmembranal.

Sin embargo, no hubo estimulación sobre el potencial en el estado 4 de la respiración (Fig.9B) indicando que sólo en condiciones fosforilantes el Ca^{2+} ejerce un efecto activador. De hecho, los resultados concuerdan con lo reportado por Panov y Scaduto (1996). Estos autores observaron que la estimulación del Ca^{2+} sobre el potencial transmembranal era dependiente de ADP en mitocondrias de corazón de rata. El resultado observado en la Fig. 9A argumenta a favor del efecto del Ca^{2+} sobre el sistema oxidativo.

El estado 4 de la respiración mitocondrial está gobernado por la permeabilidad pasiva a los protones. El coeficiente de control de flujo de la permeabilidad a protones en el estado 4 es de 0.7-0.9 (Brown *et al.*, 1990). Esto significa que la permeabilidad pasiva a H^+ controla la vía un 70-90%. Un coeficiente de control alto implica que la enzima o el paso metabólico es lo suficientemente lenta como para limitar a toda la vía, o bien, que su elasticidad o sensibilidad a las variaciones en su sustrato es baja.

Con el objeto de disminuir el Co de la permeabilidad pasiva a H^+ para aumentar el Co de la cadena respiratoria, y disminuir su velocidad, evaluamos el efecto del Ca^{2+} sobre el potencial transmembranal a 20°C en estado 4 mitocondrial (Fig.9C). No se observó estimulación del catión sobre este sistema, debido a que el cambio en la temperatura (34 a 20°C) no fue lo suficientemente grande; de hecho el $\Delta\Psi$ en los controles sin Ca^{2+} (Fig.9B y Fig.9C) es igual (150 mV) a ambas temperaturas.

Aunque se ha argumentado para mitocondrias de hígado de rata, que la dependencia del consumo de oxígeno por el gradiente electroquímico es grande sólo a bajas velocidades de la respiración (Westerhoff *et al.*,

1987), Kunz et al., (1988) observaron una gran dependencia a altas velocidades (140 ngatO/min/mg). Esto implicaría que con un pequeño cambio en el gradiente, medido como $\Delta\Psi$, provocaría una disminución abrupta en la respiración. Los resultados de la figura 9A muestran que una variación de 14°C no es suficiente para promover una disminución en el gradiente y, por tanto, en la cadena respiratoria.

El resultado de la figura 9C corrobora lo propuesto por Rolfe *et al.* (1994) y Rolfe y Brand (1996); en mitocondrias aisladas, la permeabilidad de los protones no está involucrada en el efecto de la temperatura sobre el control de la fosforilación oxidativa y que esta permeabilidad pasiva a H^+ es insensible a la acción del Ca^{2+} (Mildaziene *et al.*, 1996).

Arsenilación oxidativa.

Se seleccionaron las curvas con más del 100% de estimulación por Ca^{2+} sobre la respiración en estado 3. La concentración óptima de Ca^{2+} para obtener el máximo de estimulación varió alrededor de 800 nM (Tabla II).

El arsenato (5mM) añadido a los 6-7 minutos, estimuló la respiración hasta 89 ngatO/min/mg, un valor aproximado a la estimulación con ADP (75 ngatO/min/mg, Tabla II).

En presencia de Ca^{2+} se observó una estimulación de la arsenilación oxidativa del 22%. El carboxiatractilósido (CAT) no afectó esta respiración inducida por arsenato, corroborando que bajo estas condiciones el translocador ATP/ADP no participa. La inhibición de la arsenilación con CAT, en presencia de Ca^{2+} tiene la misma velocidad de la respiración (101 ngatO/min/mg) que la arsenilación sin CAT (89 ngatO/min/mg) o con Ca^{2+} (118 ngatO/min/mg) y, dada la desviación estándar, se puede concluir que el Ca^{2+} no estimula ni desacopla a la arsenilación oxidativa. Al añadir ADP en la arsenilación oxidativa, se involucra a la translocasa. En presencia de ADP se observó un incremento de la arsenilación (155ngatO/min/mg). En

Tabla II. EFECTO DEL Ca^{2+} SOBRE LA ARSENILACIÓN

CONDICIÓN	RESPIRACIÓN (ngatO/min/mg)
Respiración en estado 3	75 ± 27
respiración en estado 3 + 0.8 ± 0.08 μM de Ca^{2+}	177 ± 51
% de estimulación	140 ± 37 p<0.0001 (n=10)

respiración con arsenato *	89 ± 41
arsenato + Ca^{2+} **	118 ± 24
% de estimulación	22 ± 16 p<0.046 (n=10)
arsenato + Ca^{2+} + CAT	101 ± 20

arsenato + ADP *	155 ± 40
arsenato + ADP + Ca^{2+} **	202 ± 43
% de estimulación	32 ± 13 p<0.025 (n=8)
arsenato + ADP + Ca^{2+} + CAT	95 ± 19

* p=0.025 (n=8)

** p=0.025 (n=8)

Las mitocondrias (0.75 mg/ml) se incubaron en KME con succinato 5 mM, rotenona 2 μM , MgCl_2 0.6 mM y Ca^{2+} /HEDTA o carboxiatractilósido (CAT) donde se indica, a 34°C. A los 7 minutos se añadió arsenato 5 mM ± ADP y se registró el consumo de oxígeno.

presencia de Ca^{2+} se estimuló la arsenilación hasta un 32%, una estimulación significativa ($p < 0.025$) sobre la estimulación de la arsenilación sin ADP. En presencia de ADP, el CAT inhibió la arsenilación hasta su valor basal (95ngatO/min/mg), corroborando la participación de la translocasa en esta condición. Estos experimentos de arsenilación y los reportados por Moreno-Sánchez (1985) involucran al translocador de adenín nucleótidos en el efecto del Ca^{2+} sobre la fosforilación oxidativa. Sin embargo, para descartar algún efecto por desacoplamiento, (ya que bajo estas condiciones no es posible obtenerse un control respiratorio o una relación ADP/O), se determinó el efecto del Ca^{2+} sobre el potencial transmembranal con safranina en la arsenilación oxidativa.

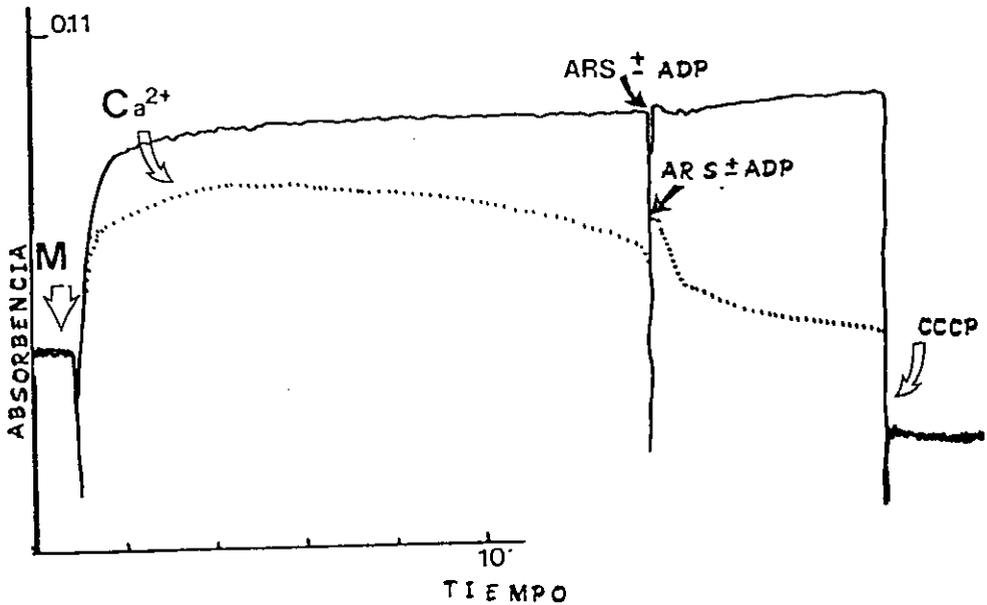


Figura 10. POTENCIAL TRANSMEMBRANAL EN LA ARSENILACIÓN OXIDATIVA

Las mitocondrias se incubaron a 34°C en KME con safranina 5 μM , Pi 2 mM, rotenona 1 μM , MgCl_2 0.6 mM, succinato 5 mM y Ca^{2+} / HEDTA 0.7 μM . A los 7 minutos se añadió arsenato 5 mM \pm ADP en exceso y se calibró con CCCP 0.5 μM . La señal se registró en un espectrofotómetro de doble haz a 554-520 nm de longitud de onda.

Se observó una disminución en el potencial transmembranal al añadir Ca^{2+} en presencia de arsenato (Figura 10). Al añadir arsenato, el potencial aumentó, ya que el arsenato ejerce el mismo efecto que el fosfato; colapsa el ΔpH . Tal disminución se transduce como un aumento en el $\Delta\Psi$. Sin embargo, en presencia de $0.8 \mu\text{M}$ del Ca^{2+} , existe una disminución en el potencial transmembranal, con y sin ADP. Este resultado sugiere que el efecto del Ca^{2+} sobre la arsenilación oxidativa, se debe en parte a un desacoplamiento. Sin embargo, cabe aclarar que para el experimento con la safranina no se determinó el control respiratorio mientras que los experimentos para la arsenilación tuvieron un porcentaje de estimulación con Ca^{2+} mayor del 100%. La disminución en el potencial debe cuantificarse por algún otro método. Más aún, el ADP es un agente protector del daño mitocondrial. La disminución en el potencial transmembranal es similar con y sin ADP (figura 10), sin embargo, la estimulación de la arsenilación es diferente, lo cual argumenta a favor del efecto del Ca^{2+} sobre el translocador.

Existe cierta paradoja en relación con el translocador ya que al incrementar el Ca^{2+} , el Co aumenta (Mildaziene *et al.*, 1995) o disminuye (Moreno-Sánchez, 1985). Si el Ca^{2+} estimulara a esta enzima su control debería disminuir (Mildaziene *et al.*, 1995) aunque no necesariamente la activación de una enzima va a mostrar una disminución en su coeficiente de control de flujo (Mildaziene *et al.*, 1995). Es pertinente aclarar que las diferencias señaladas pueden deberse al tipo de tejido utilizado (hígado ó corazón) o al sustrato empleado (2-OG o succinato).

Se han realizado estudios teóricos en los cuales se ha mostrado que puede existir un control paradójico (Kholodenko y Brown, 1996). En el control paradójico, el aumento en la actividad de la enzima va ligado al aumento en su coeficiente de control y a la estimulación del flujo de la vía. Se define como cociente de control de respuesta a la relación existente entre el coeficiente de control de flujo y el coeficiente de elasticidad. Si la

relación es positiva, el C_o de la enzima aumentará al activarse ésta y disminuirá al inhibirse la enzima. Este comportamiento se denomina paradójico. Si la relación es negativa, la activación de la enzima provocará la disminución en su coeficiente de control de flujo. Este comportamiento es el clásico. El control paradójico sugiere que el hecho de que una enzima disminuya su C_o no significa forzosamente que esta enzima se haya activado directamente por algún efector. Este análisis teórico propone que especialmente las enzimas que siguen una cinética alostérica pueden presentar este tipo de comportamiento paradójico.

Efecto del Ca^{2+} sobre la síntesis de ATP limitada al 50%.

El control de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias del hígado de rata se encuentra distribuido a nivel del translocador ATP/ADP, la ATP sintetasa y el citocromo bc_1 . Esta distribución de control varía dependiendo del sistema regenerante de ADP utilizado (hexocinasa, creatinacinasasa, piruvato cinasa, ADP en exceso, ver Moreno-Sánchez *et al.*, 1997) es decir, de la velocidad del estado 3, ya que en condiciones fisiológicas, la cadena respiratoria trabaja al 60% de su capacidad máxima, aproximadamente (Soboll, 1995).

Con el objeto de estudiar el efecto del Ca^{2+} sobre la fosforilación oxidativa en condiciones de respiración semejantes a las fisiológicas, decidimos evaluar el efecto del Ca^{2+} sobre la fosforilación oxidativa al limitar a una enzima hasta disminuir el flujo aproximadamente al 50%. Asimismo, al limitar a una de las enzimas, el control que ésta ejercía sobre la vía, aumentaría, haciéndola más susceptible a la estimulación por el Ca^{2+} , en el caso de que fuera uno de los blancos. Suponiendo a la vía como una sola enzima, los parámetros que mostrarían cambios al variar de enzima serían una V_{max} (estimulación de F.O.) y la K_m ($K_{0.5}$ para Ca^{2+}). Se realizaron las mediciones limitando cada enzima de la fosforilación oxidativa con su inhibidor específico. La síntesis de ATP fue registrada tanto como consumo

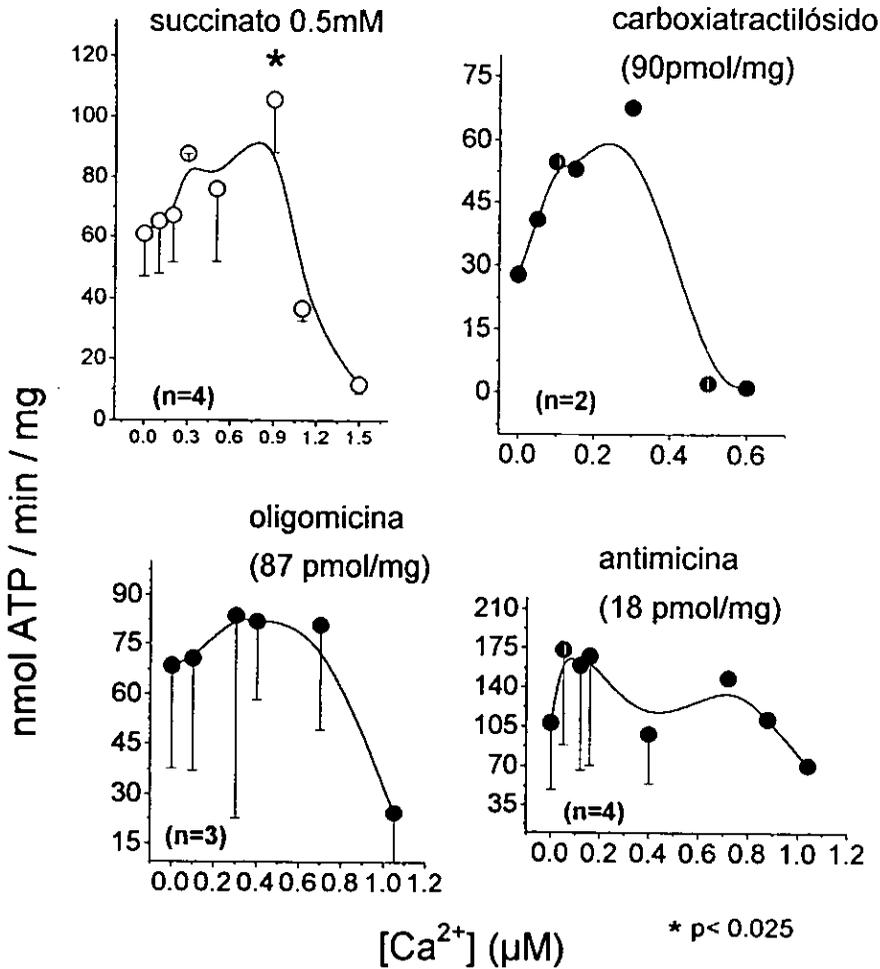


Figura 11A. EFECTO DEL Ca²⁺ SOBRE LA SÍNTESIS DE ATP INHIBIDA AL 50%

Las mitocondrias (0.75 mg/ml) se incubaron en 1 ml de KME con succinato 5 mM, rotenona 1 µM, Ca²⁺/HEDTA, MgCl₂ 0.6 mM, Pi 2 mM, el inhibidor indicado y ³²Pi a 34°C. Se añadió un exceso de ADP y se dejó fosforilar por dos minutos. La reacción se detuvo con TCA. Se cuantificó el ATP como se indica en la sección de la "Metodología".

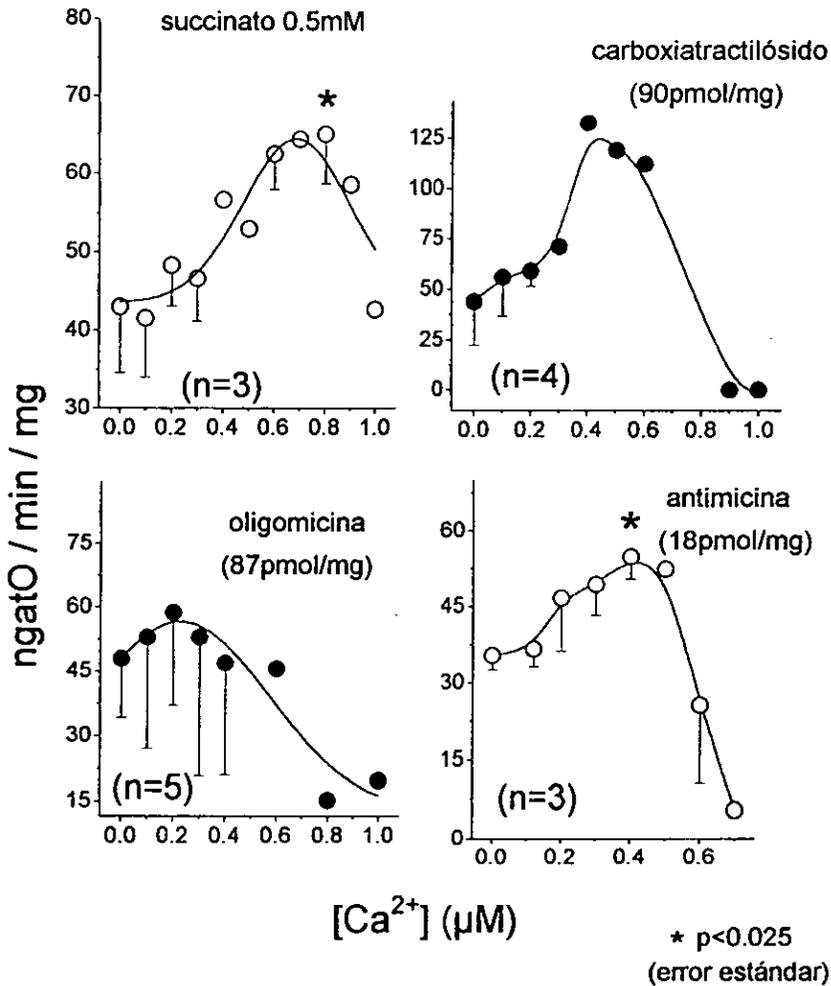


Figura 11B. EFECTO DEL Ca^{2+} SOBRE LA RESPIRACIÓN EN EL ESTADO 3 INHIBIDA AL 50%
 Las mitocondrias (0.75 mg/ml) se incubaron a 34°C en KME con succinato 5 mM, rotenona 1 μM , $MgCl_2$ 0.6 mM, Pi 2 mM, Ca^{2+} /HEDTA y el inhibidor indicado. A los 7 minutos se inició el estado 3 de la respiración al agregar 250-400 nmoles ADP.

de oxígeno en presencia de ADP como con $^{32}\text{P}_i$. Sin embargo, las curvas de estimulación por Ca^{2+} al disminuir el sustrato fueron similares, con el porcentaje de estimulación alrededor del 60% para la síntesis de ATP (Fig.11A) y del 50% para la respiración en estado 3 (Fig.11B). La estimulación del flujo por Ca^{2+} , al limitar la actividad del translocador de ATP/ADP con carboxiatractilósido fue mayor (141%, Fig.11A) para la síntesis de ATP que en las condiciones controles (succinato 5 mM, 57%, Fig.6). Además, la sensibilidad por Ca^{2+} varió en ambos sistemas, como se observa en la Tabla III.

Tabla III. $[\text{Ca}^{2+}]$ para la máxima estimulación de la F.O. inhibida al 50% (R=respiración en estado 3; A=síntesis de AT^{32}P).

Enzima con la cual se limitó la vía al 50%	$[\text{Ca}^{2+}]$ (μM) a la cual se observó la máxima estimulación	Porcentaje de Estimulación por el Ca^{2+}
Control, succinato 5 mM	R=0.64 \pm 0.07 A=0.48 \pm 0.28	R = 133 \pm 53* A = 57 \pm 24*
succinato 0.5 mM	R=0.66 \pm 0.10 A=0.73 \pm 0.13	R = 49 \pm 19 * A = 58 \pm 23 *
Complejo III mitocondrial	R=0.34 \pm 0.02 A=0.13 \pm 0.02	R = 55 \pm 12 * A = 59 \pm 43
Translocador ATP/ADP	R=0.15 \pm 0.020 A=0.27 \pm 0.04	R = 32 A = 142
ATP sintetasa	R=0.31 \pm 0.04 A=0.53 \pm 0.23	R = 30 \pm 29 A = 26 \pm 24

* $p < 0.025$

El porcentaje de estimulación se obtuvo para cada experimento y se promedió con sus repeticiones (de donde se obtuvieron las desviaciones estándar). Se muestra la concentración de Ca^{2+} con la cual se registró la máxima estimulación.

Al limitar por sustrato a la succinato deshidrogenasa, no se observaron cambios significativos en cuanto a la sensibilidad por Ca^{2+} ; sin embargo, al limitar al bc_1 y al translocador, la concentración de Ca^{2+} con la cual se obtiene la estimulación máxima es 2-3 veces menor (de $R=0.64$ y $A=0.48$ a 0.34 y 0.13 , para bc_1 y a 0.15 y 0.27 para el translocador).

Aunque los resultados para el translocador no alcanzan a ser significativamente diferentes, sí lo son para el bc_1 , en relación con el control. Al hacer a estas dos enzimas más limitantes, se acumula su sustrato, disminuyendo su elasticidad y aumentando su control. Cuando se limitó la actividad de la ATP sintetasa disminuyó la sensibilidad al Ca^{2+} de las otras enzimas de la vía (el porcentaje de la estimulación fue menor, Tabla III; $R=30\%$ y $A=26\%$). Al inhibir a cualquier otra enzima, se dió una mayor estimulación de la fosforilación oxidativa. Esto indica que cuando la ATP sintetasa controla a la vía, el efecto del Ca^{2+} es menor y cuando no la controla, el Ca^{2+} ejerce una mayor estimulación.

Porcentaje de la reducción del citocromo b.

El comportamiento del Complejo III mitocondrial se estudió por el espectro de oxidorreducción de su citocromo b. El sustrato del Sitio 2 es la quinona reducida y su producto es el citocromo c reducido; pero también el producto puede ser el citocromo b reducido. Una activación por Ca^{2+} sobre este citocromo se observaría como un incremento en la reducción del citocromo b.

Se realizaron curvas de reducción del citocromo b (expresadas como porcentaje de reducción) en presencia de concentraciones crecientes de Ca^{2+} . Se observó una estimulación por calcio sobre la actividad de este complejo (Fig.12) cuando los sustratos fueron duroquinona (59.4%) o quinona (57.7%), pero no con succinato. Asimismo, la estimulación fue mayor en el estado 4 de la respiración que en el estado 3. De hecho, en mitocondrias de corazón de rata el potencial redox del citocromo c en

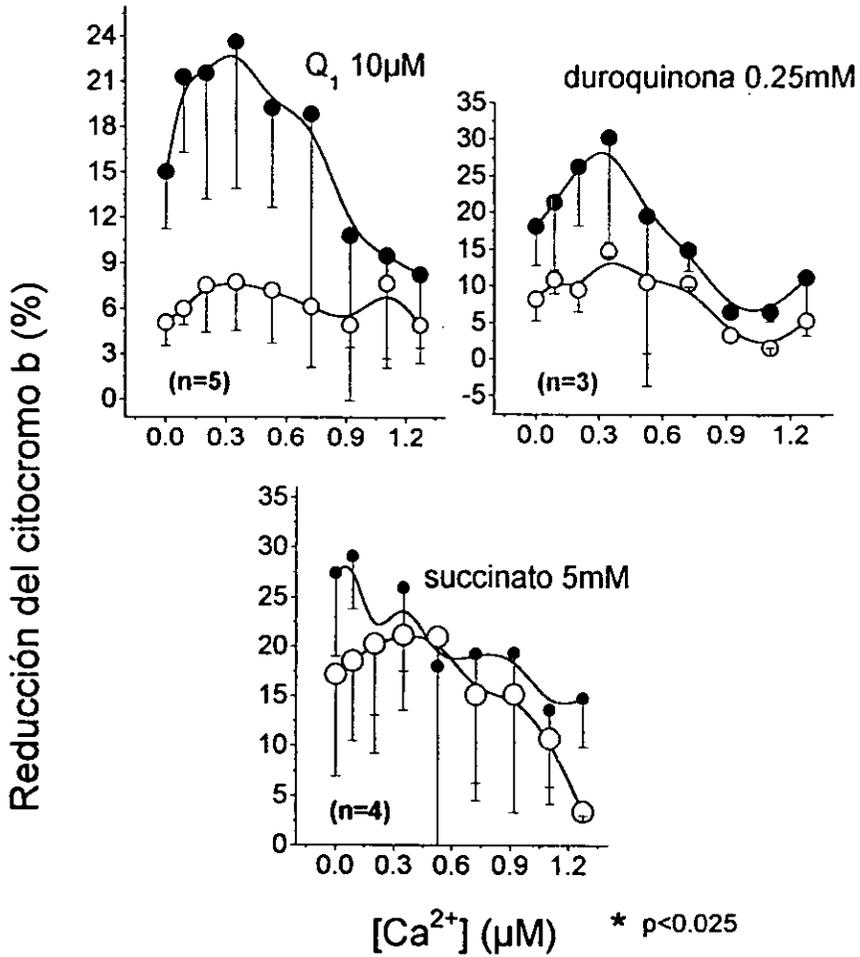


Figura 12. EFECTO DEL Ca^{2+} SOBRE EL CITOCROMO bc_1 . Las mitocondrias se incubaron con concentraciones crecientes de Ca^{2+} durante 7 minutos, con los sustratos indicados. Se añadieron 300 nmoles de ADP. A los 3 minutos se agregó CCCP 3 μM para registrar el 0% de reducción. Se añadió antimicina 2.5 μM y ditionita para el 100% de reducción. Puntos, estado 4; círculos, estado 3.

estado 3 no fue afectado al aumentar la concentración de Ca^{2+} de 5 a 230 nM (Moreno-Sánchez *et al.*, 1991). Esto se debe a que en el estado 3, se activa la fosforilación oxidativa, disminuyendo el gradiente electroquímico. Al disminuir el gradiente se activa la velocidad de la cadena respiratoria, incluyendo al bc_1 . Esta activación impide la acumulación de citocromo b reducido, minimizando el efecto del Ca^{2+} . El efecto de Q_1 y de la duroquinona es visible en estas condiciones en que sólo se sigue el patrón de óxido-reducción del citocromo b y no la actividad de la cadena respiratoria y sistema fosforilante. (Figs. 8 y 12).

Con succinato, sólo cuando se daban condiciones de estado 3 se observó efecto activador del Ca^{2+} en todos los experimentos mostrados. En ningún caso de estado 4 el Ca^{2+} activó a la F.O. Esto también fue observado para el porcentaje de reducción del citocromo b (Fig. 12, succinato). Sin embargo, en presencia de los análogos de quinona se observó cierta activación del Ca^{2+} (Fig.12, duroquinona y Q_1). Aquí cabe puntualizar que: 1) el porcentaje de reducción del citocromo b no refleja velocidades, como en todos los experimentos realizados. Esta diferencia es importante ya que no se está midiendo efectivamente la actividad del complejo, sino la acumulación del citocromo b reducido, 2) el estado estacionario alcanzado con succinato es diferente que el de las quinonas. De hecho, se observa (Fig.12 círculos) que el porcentaje de reducción es mayor con succinato (27%) que con quinonas (15-17%) en ausencia de Ca^{2+} , lo cual implica que la estimulación observada con quinonas y no con succinato se pueda deber a que las concentraciones de quinonas fueron subsaturantes y 3) aunque se observa un incremento por Ca^{2+} en el porcentaje de reducción en presencia de quinonas, éste no alcanza a activar la vía ya que en el estado 3 (Fig.12, asteriscos) no se observa estimulación.

El aumento del citocromo b reducido en esta condición refleja una activación del bc_1 sin que llegue a incrementar la velocidad de la vía. De todas formas, el resultado de las quinonas y la ligera tendencia de

activación (en el estado 3) del Ca^{2+} con succinato sobre la reducción del citocromo b sugieren que este complejo puede ser susceptible a la acción del Ca^{2+} .

Existe un resultado contradictorio en cuanto a la participación del bc_1 . En la Fig. 8A se muestra que con las quinonas no se observa estimulación de Ca^{2+} y por tanto se descarta la activación de los Sitios 2 y 3, quedando como posibilidades del sistema oxidativo, el transportador de succinato y la succinato deshidrogenasa. Por otro lado, las afinidades demostradas al limitar la vía al 50% y el ligero aumento en el porcentaje de reducción del citocromo b, en estado 3 con succinato y en estado 4 para las quinonas implican al Complejo III como sitio de activación por Ca^{2+} .

Efecto del Ca^{2+} sobre la respiración desacoplada.

Para determinar el efecto del Ca^{2+} sobre las enzimas de la cadena respiratoria, sin modificar nuestras condiciones (como sería trabajar con partículas submitocondriales) se evaluó el papel del Ca^{2+} sobre la respiración desacoplada con CCCP. Para asegurar una nula participación del sistema fosforilante, se inhibió con oligomicina. Se observó una estimulación significativa de la respiración desacoplada sólo cuando el sustrato oxidado fue el succinato (Fig.13A), con una $K_{0.5}$ de 0.22 μM y una estimulación máxima a 0.36 μM de Ca^{2+} del 37%. Con las quinonas no se estimuló la respiración desacoplada (Fig.13B y 13D) mientras que con TMPD no hubo cambio en presencia del CCCP (Fig.13C), es decir que las mitocondrias ya mostraban desacoplamiento. Antes de la adición de oligomicina se registró el estado 4 de la respiración mitocondrial (Fig.12A, círculos abiertos) como un control de que el Ca^{2+} por sí mismo no es el agente desacoplante, ya que a altas concentraciones de Ca^{2+} , se ha observado un desacoplamiento y posteriormente una inhibición de la fosforilación oxidativa (Moreno-Sánchez, 1985). Estos resultados sugieren un efecto del Ca^{2+} a nivel del sistema oxidativo. La estimulación de la

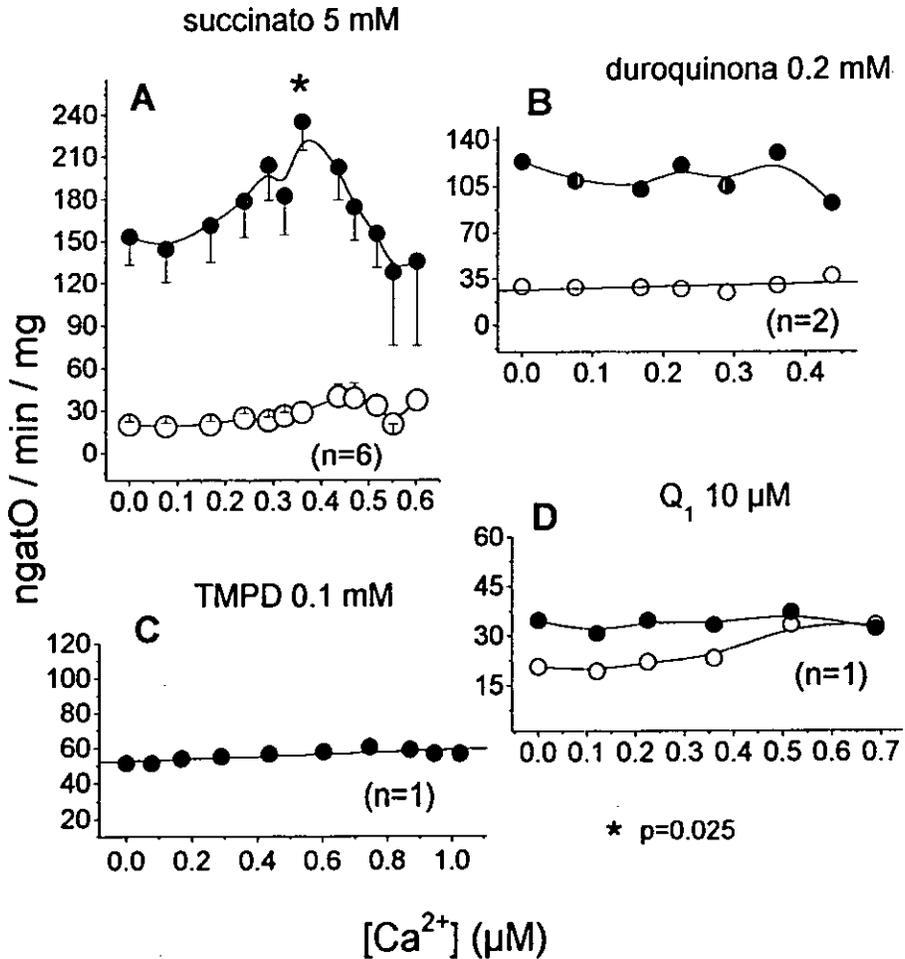


Figura 13. ESTIMULACIÓN DE LA RESPIRACIÓN DESACOPLADA

Las mitocondrias se preincubaron durante 6 minutos a 34°C en presencia de Ca²⁺ y con el sustrato indicado. Al sexto minuto se agregó 1 nmol de oligomicina y un exceso de ADP. Al minuto 7 se añadió CCCP 0.3 μ M. Estado 4, círculos; estado 3, puntos.

respiración desacoplada al incrementar la concentración de Ca^{2+} se observó en mitocondrias de hígado de rata, por Murphy *et al.*, (1990) y Moreno-Sánchez (1985).

CONCLUSIONES

El control de la producción del ATP es un mecanismo complejo. Diversos estudios muestran que el aumento en el consumo del oxígeno no depende exclusivamente de la variación en la concentración de los compuestos de alta energía. Al incrementarse el trabajo celular, llega un momento en que la velocidad del consumo del ATP es igual que la velocidad de la producción del ATP; en este estado estacionario, se ha observado que las concentraciones del ADP, ATP y del fosfato pueden permanecer constantes (Doeller y Wittenberg, 1990). Asimismo, el incremento en el potencial redox, generado por los niveles de los nucleótidos de piridina (Koretsky y Balaban, 1987), no es suficiente para explicar la alta respiración observada al aumentar el trabajo celular (Katz *et al.*, 1989).

La fosforilación oxidativa está controlada también por los niveles celulares de Ca^{2+} , que actúa como un activador de tres deshidrogenasas de la matriz mitocondrial (Denton y McCormack, 1980; Hansford, 1980). Se cree que la función del Ca^{2+} en la matriz es prevenir una disminución en la relación ATP/ADP al estimular la producción del ATP y su utilización simultáneamente (Soboll, 1995). Otra función alternativa es la de prevenir un gasto excesivo de la energía libre a través de la permeabilidad pasiva a los protones; se asume generalmente que el Ca^{2+} solo tiene un papel regulador en las células estimuladas y no en las células en reposo (Soboll, 1995), en las cuales se tiende a un estado 4 de la respiración. Este estado 4 está gobernado por la permeabilidad pasiva a los protones.

La modulación del Ca^{2+} sobre la fosforilación oxidativa no es solamente a través de las deshidrogenasas. Las evidencias experimentales involucran al Complejo III mitocondrial (Murphy *et al.*, 1990), la poza de quinonas (Halestrap y Dunlop, 1986), el translocador de ATP/ADP (Moreno-

Sánchez, 1985) y la ATPasa (Das y Harris, 1990b; Rouslin y Broge, 1989; Yamada y Huzel, 1988).

Bajo las condiciones del 100% de la respiración en el estado 3 y con una temperatura de 34°C, al preincubar a las mitocondrias del hígado durante 7 minutos con Ca^{2+} , encontramos una estimulación de la fosforilación oxidativa independiente de las deshidrogenasas. La estimulación de la respiración desacoplada y del gradiente eléctrico al elevar la concentración del Ca^{2+} , indican que el Ca^{2+} actúa sobre el sistema oxidativo. Debido a que el Ca^{2+} no estimuló a la fosforilación oxidativa cuando utilizamos TMPD como sustrato del Sitio 3; concluimos que la estimulación sobre el sistema oxidativo es a nivel del Complejo III y/o el transportador del succinato.

La estimulación de la fosforilación oxidativa por el Ca^{2+} y su efecto al limitar a la vía al 50%, muestran que el Ca^{2+} estimula al sistema fosforilante. Existen evidencias que muestran que el acarreador de fosfatos es la enzima más rápida de la mitocondria (Ligeti *et al.*, 1988). Nuestros resultados indican que a pesar de estar saturado este acarreador, la estimulación por el Ca^{2+} se mantiene. Por otro lado, el efecto del Ca^{2+} sobre la ATPasa sólo se ha observado en condiciones de hidrólisis, no de síntesis. Por tanto, se sugiere que el papel del Ca^{2+} sobre el sistema fosforilante es a nivel del translocador de los nucleótidos de adenina.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- Akerman KEO y Nicholls, DG. (1983) Physiological and bioenergetic aspects of mitochondrial calcium transport. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 95: 149-201.
- Bertina RM, Schrier PI and Slater EC (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 305: 503-518.
- Beutner G, Rück A, Riede B, Welte W y Brdiczka D. (1996) Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett.* 396: 189-195.
- Block MR, Pougeois R y Vignais PV (1980) *FEBS Lett.* 117: 335-340.
- Brown GC, Lakin-Thomas P y Brand MD (1990) Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells. *Eur. J. Biochem.* 192: 355-362.
- Brown GC (1992) Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem. J.* 284: 1-13.
- Brustovetsky N y Klingenberg M. (1996) Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca^{2+} . *Biochemistry* 35: 8483-8488.
- Corkey BE, Duszynski J, Rich TL, Matschinsky B y Williamson JR. (1986) Regulation of free and bound magnesium in rat hepatocytes and isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 261: 2567-2574.
- Coty WA y Pedersen PL (1975) Phosphate transport in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 250: 3515-3521.
- Crompton M. (1985) The regulation of mitochondrial calcium transport in heart. *Curr. Top. Membr. Transp.* 25: 231-276.
- Das AM y Harris DA (1990) Control of mitochondrial ATP synthase in heart cells: inactive to active transitions caused by beating or positive inotropic agents. *Cardiovasc. Res.* 24: 411-417.
- Das AM y Harris DA (1990) Regulation of the mitochondrial ATP synthase in intact rat cardiomyocytes. *Biochem. J.* 266: 355-361.
- Denton RM y McCormack JG (1980) On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. *FEBS Lett.* 119: 1-8.
- Devin A, Guérin B y Rigoulet M. (1996) Dependence of flux size and efficiency of oxidative phosphorylation on external osmolarity in isolated rat liver mitochondria: role of adenine nucleotide carrier. *Biochim. Biophys. Acta* 1273: 13-20.
- Doeller JE y Wittenberg BA (1990) Intracellular calcium and high-energy phosphates in isolated cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 259: H1851-H1859.

- Doussiere J, Ligeti E, Brandolin G y Vignais PV (1984) Control of oxidative phosphorylation in rat heart mitochondria. The role of the adenine nucleotide carrier. *Biochim. Biophys. Acta* 766: 492-500.
- Fonyo A y Vignais PV (1980) *J. Bioenerg. Biomembr.* 12: 137-149.
- Garduño JP, Espinosa-García MT, Pardo JP y Martínez F. (1992) Effect of calcium on mitochondria from human term placenta. *Placenta* 13: 535-544.
- Gellerich FN, Bohnensack R y Kunz W (1983) Control of mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta* 722: 381-391.
- Gresser MJ (1981) ADP-arsenate. Formation by submitochondrial particles under phosphorylating conditions. *J. Biol. Chem.* 256: 5981-5983.
- Groen AK, Wanders RJA, Westerhoff H, Van der Meer R y Tager JM (1982b) Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* 257: 2754-2757.
- Halestrap AP (1989) The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 973: 355-382.
- Halestrap AP, Quinlan PT, Whipps DE y Armston AE (1986) Regulation of the mitochondrial matrix volume in vivo and in vitro. The role of calcium. *Biochem. J.* 236: 779-787.
- Halestrap AP y Dunlop JL (1986) Intramitochondrial regulation of fatty acid- β -oxidation occurs between flavoprotein and ubiquinone. A role of changes in matrix volume. *Biochem. J.* 239: 559-565.
- Hansford RG (1980) Control of mitochondrial substrate oxidation. *Curr. Top. Bioenerg.* 10: 217-278.
- Hansford RG (1985) Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. *Rev. physiol. Biochem. Pharmacol.* 102: 1-72.
- Hatefi Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation System. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 1015-1069.
- Heinrich R y Rapoport T (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. *Eur. J. Biochem.* 42: 89-95.
- Hubbard MJ y McHugh NJ (1996) Mitochondrial ATP synthase F_1 - β -subunit is a calcium binding protein. *FEBS Lett.* 391: 323-329.
- Inomoto T, Tanaka A, Mori S, Bong Jin M, Sato B, Yanabu N, Tokuka A, Kitai T, Ozawa K y Yamaoka Y. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1188: 311-317.

- Johnston JD y Brand MD (1987) Stimulation of the respiration rate of rat liver mitochondria by sub-micromolar concentrations of extramitochondrial Ca^{2+} . *Biochem. J.* 245: 217-222.
- Jung DW y Brierley GP. (1986) Matrix magnesium and the permeability of heart mitochondria to potassium ion. *J. Biol. Chem.* 261: 6408-6415.
- Jung DW, Apel L y Brierley GP (1990) Matrix free Mg^{2+} changes with metabolic state in isolated heart mitochondria. *Biochemistry* 29: 4121-4128.
- Kacser H y Burns JA (1973) The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 7: 65-104.
- Katz LA, Swain JA, Portman MA y Balaban RS (1989) Relation between phosphate metabolites and oxygen consumption in heart in vivo. *Am. J. Physiol.* 256: H265-H274.
- Khodjaev EYu, Komamitsky F, Capozza G, Dukhovich VF, Chernyak B y Papa S (1990) Activation of a complex of ATPase with the natural protein inhibitor in submitochondrial particles. *FEBS Lett.* 272: 145-148.
- Kholodenko B y Brown G (1996) Paradoxical control properties of enzymes within pathways: can activation cause an enzyme to have increased control? *Biochem, J.* 314: 753-760.
- Khym, JX (1975) *Clin. Chem.* 21: 1245-1252.
- Klein G, Satre M, Zaccai G y Vignais PV (1982) Spontaneous aggregation of the mitochondrial natural ATPase inhibitor in salt solutions as demonstrated by gel filtration and neutron scattering. *Biochim. Biophys. Acta* 681: 226-232.
- Koretsky AP y Balaban RS (1987) Changes in pyridine nucleotide levels alter oxygen consumption and extra-mitochondrial phosphates in isolated mitochondria: a ^{31}P -NMR and NAD(P)H fluorescence study. *Biochim. Biophys. Acta* 893: 398-408.
- Kotlyar AB y Vinogradov AD (1990) Slow active / inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1019: 151-158.
- Kotlyar AB, Sled VD y Vinogradov AD (1992) Effect of Ca^{2+} ions on the slow active / inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 144-150.
- Kozlov I y skulachev VP (1977) H^+ -Adenosine triphosphatase and membrane energy coupling. *Biochim. Biophys. Acta* 463: 29-89.
- Krämer R, Mayr U, Heberger C y Tsompanidou S. (1986) Activation of the ADP/ATP carrier from mitochondria by cationic effectors. *Biochim. Biophys. Acta.* 855: 201-210.
- Kröner H. (1988) Spermine, another specific allosteric activator of calcium uptake in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 267: 205-210.

- Kunz W, Gellerich FN, Schild L y Schönfeld P. (1988) Kinetic limitation in the overall reaction of mitochondrial oxidative phosphorylation accounting for flux-dependent changes in the apparent $Gp/\mu H^+$ ratio. *FEBS Lett.* 233: 17-21.
- Leisey JR, Grotyohann LW, Scott DA y Scaduto RC Jr. (1993) Regulation of cardiac mitochondrial calcium by average extramitochondrial calcium. *Am. J. Physiol.* 265: H1203-H1208.
- Ligeti E, Brandolin G, Dupont Y y Vignais P (1985) *Biochemistry* 24: 4423-4428.
- Lötscher HR, Winterhalter KH, Carafoli E y Righther C (1980) The energy-state of mitochondria during the transport of Ca^{2+} . *Eur. J. Biochem.* 110: 211-216.
- McCormack JG (1985) Evidence that adrenaline activates key oxidative enzymes in rat liver by increasing intramitochondrial $[Ca^{2+}]$. *FEBS Lett.* 180:259-264.
- Martínez F, Chávez E y Echeگویen S (1987) Decreased exchange of adenine nucleotides in human placental mitochondria. *Int. J. Biochem.* 19: 275-279.
- McCormack JG (1985) Characterization of the effects of Ca^{2+} on the intramitochondrial Ca^{2+} -sensitive enzymes from rat liver and within intact rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 231: 581-595.
- McCormack J., Halestrap A. y Denton R. (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* 70: 391-425.
- Mildaziene V, Baniene R, Nauciene Z, Bakker BM, Brown GC, Westerhoff HV y Kholodenko BN (1995) Calcium indirectly increases the control exerted by the adenine nucleotide translocator over 2-oxoglutarate oxidation in rat heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 324: 130-134.
- Mildaziene V, Baniene R, Nauciene Z, Marcinkeviciute A, Morkuniene R, Borutaite V, Kholodenko BN y Brown GC (1996) Ca^{2+} stimulates both the respiratory and phosphorylation subsystems in rat heart mitochondria. *Biochem. J.* 320: 329-334.
- Mitchell P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Res. Rep.* 66/1, Bodwin, Cornwall, England: Glynn Res. Ltd.
- Miyata H, Silverman, HS, Sollott SJ, Lakatta EG, Stern MD y Hansford RG (1991b) Measurement of mitochondrial free Ca^{2+} -concentration in living single rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 261: H1123-H1134.
- Moreno-Sánchez R. (1985a) Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free Ca^{2+} concentrations. *J. Biol. Chem.* 260: 4028-4034.
- Moreno-Sánchez R. (1985b) Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP Synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260: 12554-12560.

- Moreno-Sánchez R. (1985c) Papel del Ca^{2+} en la regulación de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Tesis de Doctorado, U.N.A.M.
- Moreno-Sánchez R, Devars S, López-Gómez F, Uribe A y Corona N (1991) Distribution of control of oxidative phosphorylation in mitochondria oxidizing NAD-linked substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1060: 284-292.
- Moreno-Sánchez R, Hogue BA y Hansford RG (1990) Influence of NAD-linked dehydrogenase activity on flux through oxidative phosphorylation. *Biochem. J.* 268: 421-428.
- Moreno-Sánchez R, Torres-Márquez ME y López-Gómez FJ (1993) La determinación de la concentración de calcio libre en células y mitocondrias con indicadores fluorescentes. *Ciencia* 44: 383-396.
- Moreno-Sánchez R y Torres-Márquez ME (1991) Control of oxidative phosphorylation in mitochondria, cells and tissues. *Int. J. Biochem.* 23: 1163-1174.
- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Zavala JS, Castillo A, Rodríguez-Enríquez S y Bravo C. (1997) Control fisiológico de la fosforilación oxidativa. Avances recientes, en: Mensaje Bioquímico. XXIV Taller de actualización bioquímica. Depto. de Bioquímica, Fac. Medicina, U.N.A.M.
- Murphy A., Kelleher JK y Fiskum G. (1988) Calcium sensitive isocitrate and 2-oxoglutarate dehydrogenase activities in rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 1218-1225.
- Murphy A., Kelleher JK y Fiskum G. (1990) Submicromolar Ca^{2+} regulates phosphorylating respiration by normal rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 265: 10527-10534.
- Nicchitta VC y Williamson JR. (1984) Spermine: a regulator of mitochondrial calcium cycling. *J. Biol. Chem.* 254: 12978-12983.
- Nicholls DG y Ferguson SJ. (1992) Chapter 4: The chemiosmotic proton circuit, en: *Bioenergetics 2*. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.
- Otto DA y Ontko JA (1982) Structure-function relations between fatty acid oxidation and the mitochondrial inner-membrane-matrix region. *Eur. J. Biochem.* 129: 479-485.
- Panov AV y Scaduto RC Jr. (1996) Substrate specific effects of calcium on metabolism of rat heart mitochondria. *Am. J. Physiol.* 270: H1398-H1406.
- Panov AV y Scaduto RC Jr. (1995) Influence of calcium on NADH and succinate oxidation by rat heart submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 316: 815-820.
- Patel TB, Sambasivarao D y Rashed HM (1988) Role of calcium in synaptosomal substrate oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 264: 368-375.

Rizzuto R, Brini M, Murgia M y Pozzan T. (1993) Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262: 744-747.

Rolfe DFS, Hulbert AJ y Brand MD (1994) Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1118: 405-416.

Rolfe DFS y Brand MD (1996) Proton leak and control of oxidative phosphorylation in perfused, resting rat skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1276: 45-50.

Rodríguez-Zavala JS, Saavedra-Molina A y Moreno-Sánchez R. (1997) Effect of intramitochondrial Mg^{2+} on citrulline synthesis in rat liver mitochondria. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41: 179-187.

Rottenberg H. (1984) Membrane potential and surface potential in mitochondria: uptake and binding of lipophilic cations. *J. Membrane. Biol.* 81: 127-138.

Rouslin W y Broge CW (1989) Factors affecting the reactivation of the mitochondrial adenosine 5'-Triphosphatase and the release of ATPase inhibitor protein during and following the reenergization of mitochondria from ischemic cardiac muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 275:385-394.

Saks V, Kuznetsov A, Khuchua Z, Vasilyeva E, Belikova J, kesvatara T y Tiivel T. (1995) Control of cellular respiration in vivo by mitochondrial outer membrane and by creatine kinase. A new speculative hypothesis: possible involvement of mitochondrial-cytoskeleton interactions. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27: 625-645.

Soboll S (1995) Regulation of energy metabolism in liver. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27: 571-582.

Wanders RJA, Groen AK, Van Roermund CWT y Tager JM (1984b) Factors determining the relative contribution of the adenine-nucleotide translocator and the ADP-regenerating system to the control of oxidative phosphorylation in isolated rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 142: 417-424.

Westerhoff HV, Plomp PJAM, Groen AK, Wanders RA, Bode JA y van Dam K (1987) On the origin of the limited control of mitochondrial respiration by the adenine nucleotide translocator. *Arch. Biochem. Biophys.* 257: 154-169.

Yamada EW y Huzel NJ (1989) Calcium-binding ATPase inhibitor protein of bovine heart mitochondria. Role in ATP synthesis and effect of Ca^{2+} . *Biochemistry* 28: 9714-9718.

Yamada EW, Huzel NJ y Dickison JC (1981) Reversal by uncouplers of oxidative phosphorylation and by Ca^{2+} of the inhibition of mitochondrial ATPase activity by the ATPase inhibitor protein of rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 256: 10203-10207.

Zakharov SD, Li X, Red'ko TP y Dilley RA (1996) Calcium binding to the subunit c of *E. coli* ATP-synthase and possible functional implications in energy coupling. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28: 483-494.