

03062



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

17
2ej

CARACTERIZACION Y AISLAMIENTO DEL ACARREADOR DE CALCIO EN MITOCONDRIAS DE GERMEN DE Phaseolus vulgaris

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
M A E S T R I A E N I. B. B.
P R E S E N T A :
H O R A C I O R E Y E S V I V A S

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

264149



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.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	II
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	2
→ Anatomía y función mitocondrial	3
→ Membranas biológicas y transporte selectivo.	7
ANTECEDENTES	10
→ Transporte de calcio.	10
→ Evidencias y características del uniportador.	12
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y METODOS	21
→ Material biológico.	21
→ Aislamiento de mitocondrias.	21
→ Determinación del potencial transmembranal	22
→ Formación de mitoplastos.	22
→ Obtención de partículas submitocondriales.	24
→ Oximetría	24
→ Determinación del transporte de calcio en mitocondrias.	25
→ Formación de proteoliposomas.	25
→ Incorporación de proteínas mitocondriales a proteoliposomas.	27
→ Transporte de calcio en proteoliposomas.	27
→ Determinación de la actividad de la monoamino oxidasa.	28
→ Esquema de purificación del acarreador de calcio.	29

→ Isoelectroenfoque preparativo de fase acuosa. -----	30
→ Producción de anticuerpos de gallina. -----	32
→ Titulación de anticuerpos por medio del ensayo de inmunoabsorción por unión de enzima (ELISA). -----	33
RESULTADOS -----	35
→ Respirometría y determinación de potencial transmembranal. ----	35
→ Transporte de calcio radioactivo mitocondrial. -----	38
→ Aislamiento del acarreador de calcio de mitocondrias de germen de frijol. -----	44
→ Separación por medio de solventes orgánicos (cloroformo-butanol). 44	
→ Aislamiento por precipitación con $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ e inmunofinidad. --	49
→ Producción de anticuerpos (IgY) dirigidos contra la FR. -----	52
→ Purificación mediante isoelectroenfoque preparativo en fase acuosa de PSM e inmunofinidad. -----	55
→ Fraccionamiento por inmunofinidad -----	56
→ Determinación de la actividad de las fracciones obtenidas por inmunofinidad -----	60
DISCUSION -----	66
→ Transporte de Ca^{2+} . -----	66
→ Aislamiento del acarreador de Ca^{2+} . -----	69
→ Extracción con solventes orgánicos. -----	69
→ Aislamiento por precipitación e inmunofinidad. -----	71
→ Aislamiento por isoelectroenfoque e inmunofinidad -----	72
CONCLUSIONES. -----	77
PERSPECTIVAS. -----	78

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo se realizo con el apoyo del donativo de CONACyT 047N así como de la beca-credito con No. de registro 85928.

Este trabajo se llevó a cabo en el Depto. De Bioquímica del Instituto Nat. De Cardiología bajo la tutoria del Dr. Edmundo Chavez Cosio a quien le agradezco profundamente, no sólo por formarme académica y profesionalmente, sino también por ofrecerme su más sincera amistad y apoyo.

A los miembros del comité tutorial por sus sugerencias a este trabajo.

Agradezco a Horacio y Alicia quienes conocen el verdadero significado de ser padres.....

A Isabel y Tomas quienes injustamente debieron esperar hasta ser abuelos para celebrar fiestas de graduación en casa.....

A Edith por su apoyo, pero sobre todo por la paciencia que me tiene..... hasta ahora.

Dentro de mí me apiño,
en mí mismo me hacino y al apiñarme me derramo,
soy lo extendido dilatándose, lo repleto vertiéndose
y llenándose.....

(De "Mutra")

Octavio Paz.

RESUMEN.

Este trabajo presenta estudios sobre la caracterización y purificación parcial del acarreador de calcio en mitocondrias de plántulas de *Phaseolus vulgaris*. Los estudios cinéticos demuestran la existencia de un transporte de calcio de tipo electroforético, dependiente de Pi como anión permeante. Dicha captación no requiere de la presencia de ADP. La cinética del acarreador de Ca²⁺ mostró poca cooperatividad con un coeficiente numérico de Hill de 1.759 ± 0.381 . Los valores de $K_{0.5}$ y $V_{max}mg^{-1}$ que se obtienen son de $115.5 \mu M$ y $38.37 \text{ nmol Ca}^{2+} \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ respectivamente. El valor de la $K_{0.5}$ es similar al que se reportó para mitocondrias de mamíferos, en tanto que la V_{max} es cuarenta veces menor a lo reportado en mitocondrias de corazón de perro ($1700 \text{ nmol Ca}^{2+} \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Por otra parte, la velocidad de transporte del catión es más lenta que el bombeo de H⁺ por la cadena de transporte de electrones. El transporte de calcio es sensible a rojo de rutenio en el intervalo de concentraciones micromolares. El acarreador de calcio pudo aislarse por medio de tres diferentes métodos. En cada método se presentaron distintas actividades y coincidieron en el aislamiento de una banda de aproximadamente 30 kDa. El protocolo de purificación que permitió mayor rendimiento y actividad específica fue aquel que involucró técnicas de isoelectroenfoque preparativo junto con inmunoquímica. En dichas condiciones, la cantidad total de la fracción de proteína que se obtuvo fue de aproximadamente 1 mg (corresponde a un rendimiento del 0.1 %) con una actividad de $279.3 \text{ nmol Ca}^{2+}/\text{mg}/45 \text{ min}$. El número de bandas protéicas que se aisló con éste protocolo fue de seis.

ABREVIATURAS:

- $\Delta\psi$: Potencial transmembranal.
 $\Delta_{p}H^{+}$: Fuerza proton motriz.
 ΔG° : Energía libre de Gibbs.
 $AcO^{-}Na^{+}$: Acetato de sodio
BSA: Albúmina sérica de bovino.
CCCP: Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona.
CHAPS: 3-[(3-Colamidopropyl)-dimetilamonio]-1-propanesulfonato.
 $DiSC_3$: Ditiocarbocianina.
DMSO: Dimetilsulfóxido.
DTT: Ditioneitol
EDTA: Ac. etilendiaminotetracético.
EGTA: Ac. etilen glicol-bis(β -aminoethyl eter) N,N,N',N'-tetraacético
FLP: Fosfolípido
HEPES: Ac. N-(2-hidroxiethyl) piperazina-N'(2-etanosulfónico)
h: Coeficiente numérico de Hill
IgG: Anticuerpos de ratón.
IgY: Anticuerpos de gallina.
MAO: Monoamino oxidasa.
MOPS: Ac. 3-[N-Morpholino]propanesulfónico.
PEG-8000: Polietilenglicol con PM 8,000
Pi: Fosfato inorgánico.
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonil.
PSM: Partículas submitocondriales
PVP 40,000 insol: Polivinilpirrolidona insoluble.
R.R.: Rojo de rutenio.
TEA: Trietiletanolamina.
TMPD: N,N,N',N'-tetrametil p-metilendiamina.
TRIZMA base: Tris(hidroximetil)aminometano.
FB: Fracción protéica que se obtiene a partir de un fraccionamiento consecutivo por isoelectroenfoque preparativo seguido de una columna de inmunoafinidad.
FO: Fracción proteica extraída por solventes orgánicos
FR: Fracción protéica que se obtiene a partir de un fraccionamiento consecutivo por precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ seguido de una columna de inmunoafinidad.

INTRODUCCION.

Dentro de las características que definen a las células eucariotas se encuentra la de presentar en su interior complejos membranosos denominados "orgánulos". Tales orgánulos cuyo origen evolutivo fue el de un evento endosimbiótico entre procariontes, contienen cantidades considerables de proteínas que conforman una vía metabólica y que se restringen en un volumen muy reducido. Esta condición permite acercar espacialmente a las enzimas, incrementándose así la velocidad de interacción entre ellas y entre sus sustratos. Debido a ello los orgánulos particularizan las actividades metabólicas y de esta manera, distribuyen los procesos celulares (síntesis de proteínas, digestión celular, construcción de material genético, etc.)

De esta forma, al aislar a los diferentes orgánulos para su estudio individual se permiten dos objetivos principales: diseccionar las actividades metabólicas en condiciones que permitan cuantificar química, cinética, y molecularmente a las proteínas que conforman al orgánulo; y analizar los procesos metabólicos que por razones técnicas solo pueden determinarse cuando el orgánulo se encuentra sin la intervención de otros componentes celulares. La información que se obtiene podrá, en el futuro ser integrada para predecir las aportaciones individuales de cada orgánulo, producto de estímulos extracelulares o de cambios en el ciclo de vida celular.

En particular, el estudio de los procesos mitocondriales siempre abarca un punto central en la bioquímica, así como en las áreas asociadas a la investigación. Dicho orgánulo presenta un enorme número de funciones metabólicas que son esenciales para la mayoría de las células eucariotas. Probablemente la función que más se conoce es la de transformar la fuerza de un gradiente electroquímico en enlaces de alta energía como son los del ATP, que a su vez se aprovecha para tres principales actividades: a) sufragar el costo de la síntesis de macromoléculas y otras moléculas de importancia biológica, a partir de compuestos más simples; b) mantener la

distribución iónica y el transporte activo de iones y moléculas a través de las membranas de las células; y c) cubrir las necesidades energéticas del trabajo mecánico, es el caso de la motilidad en los organismos unicelulares y la actividad muscular en los animales superiores. Sin embargo, en la mitocondria se llevan a cabo procesos tan diversos como la transformación de hormonas esteroideas tales como la pregnenolona (Papadopoulos y cols. 1992), o la terminación de síntesis de los glucocorticoides y mineralocorticoides (Black y cols, 1994), así como el catabolismo de amino ácidos.

Este trabajo estudia una de las características importantes de la mitocondria: la de transportar selectivamente iones a través de la membrana interna. En particular se estudia la cinética de la captación de Ca^{2+} y las proteínas implícitas en el transporte del catión. Sin embargo, antes de profundizar acerca del transporte selectivo de iones conviene describir un panorama general de las funciones mitocondriales y su localización dentro del orgánulo.

ANATOMIA Y FUNCION MITOCONDRIAL:

Debido a que las células eucariotas son extraordinariamente diversas, es de esperar que sus mitocondrias varíen también considerablemente en tamaño y forma. No obstante, la forma típica es elipsoidal con un diámetro de aproximadamente 0.5 μm y una longitud de 1 μm . La mitocondria presenta cuatro principales regiones: dos membranas, una externa y otra interna con múltiples invaginaciones; y dos espacios que se delimitan por estas dos membranas. Los espacios se denominan como “espacio intermembranal” y “espacio de la matriz” (Figura 1). Cada región se asocia a funciones específicas mitocondriales. La Tabla 1 enlista las principales funciones, las proteínas involucradas, y su ubicación en el orgánulo. El número de invaginaciones o “crestas” que presenta la membrana interna varía con la actividad metabólica de la

célula y por tanto, de la cantidad de ATP que se produce y consume para dicha actividad. Casi todas las proteínas del transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa son transmembranales, de modo que la velocidad de respiración es directamente proporcional al área de la superficie de la membrana. Cerca del 75 % del peso de la membrana se debe a la fracción proteica.

El estado de la matriz mitocondrial se parece al de un estado de gel por la presencia de una gran concentración de enzimas (por ejemplo, las del ciclo del ácido tricarboxílico), en un ambiente que contiene menos del 50 % de agua. Además, la matriz tiene la maquinaria genética (DNA, RNA y ribosomas) para generar algunas de las proteínas mitocondriales.

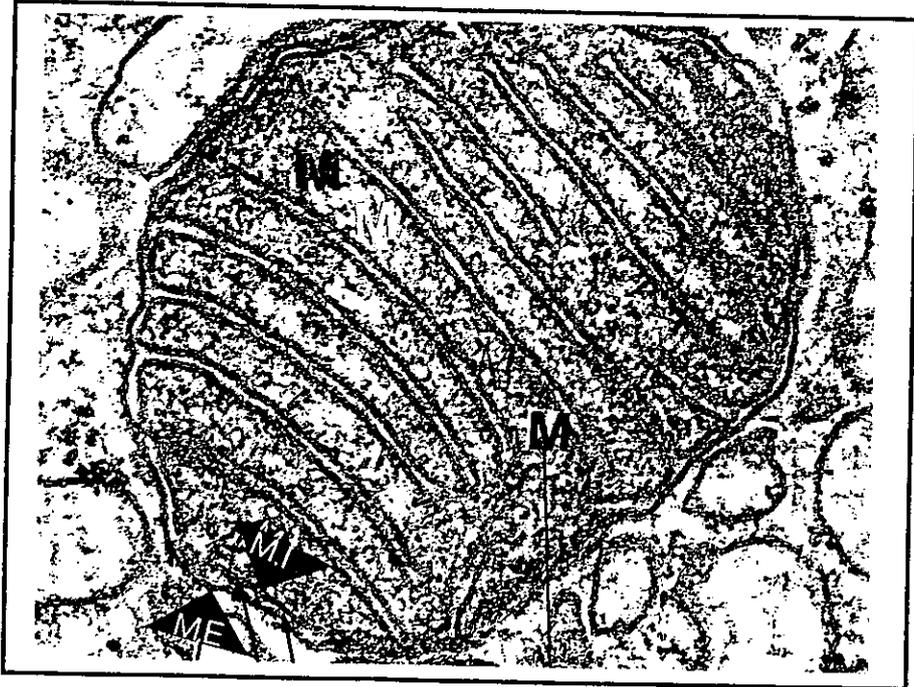


Fig. 1.- Micrografía electrónica de un corte mitocondrial, en él se observa la membrana externa (M.E); membrana interna (M.I); y la matriz (M). Las crestas provienen de múltiples invaginaciones de la membrana interna.

Tabla 1: Compartimentalización de las funciones mitocondriales y las enzimas que se asociadas (tomada de Darley-Usmar et al. A practical approach (1987).

FUNCION	PROTEINAS(S) ASOCIADA(S)
<i>MEMBRANA EXTERNA</i>	
Oxidación de aminas aromáticas neuroactivas	Monoamino oxidasa
Biosíntesis de cardiolipina	Glicerolfosfato aciltransferasa
Transporte de ácidos nucleicos y de proteínas que se sintetizan en el citoplasma	Por ejemplo: MOM 19; MAS 70; ISP 42.
Transferencia de electrones	NADH citocromo <i>c</i> reductasa (insensible a rotenona). Su función no se comprende bien
<i>ESPACIO INTERMEMBRANAL</i>	
Mantenimiento del balance de nucleótidos de adenina	Adenilato cinasa Nucleósido difosfocinasa Nucleósido monofosfocinasa
Transferencia de electrones desde el complejo III al complejo IV de la cadena respiratoria	Citocromo <i>c</i>
Procesamiento de proteínas que se importan desde el citoplasma	Por ejemplo: HSP 70.
<i>MEMBRANA INTERNA</i>	
Fosforilación oxidativa	Cuatro complejos para transferir electrones, tres de estos complejos acoplan dicha transferencia al bombeo de H ⁺ ; y la ATP _{sintetasa} .
Transporte de nucleótidos de piridina	La translocasa de ADP/ATP
Transporte de Ca ²⁺	El unipotador de calcio El antiportador Na ⁺ /Ca ²⁺ El antiportador H ⁺ /Ca ²⁺

Transporte de metabolitos	El acarreador de piruvato, el antiportador $H_2PO_4^-/OH^-$, el acarreador de dicarboxilato, el antiportador citrato/malato, la lanzadera de carnitina.
<i>MATRIZ</i>	
Oxidación del piruvato a acetil CoA	El complejo piruvato deshidrogenasa
Oxidación de cuerpos cetónicos	Por ejemplo: la 3-cetoacil CoA transferasa
Oxidación de aminoácidos	Por ejemplo: glutaminasa, glutamato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa, α -cetoglutarato transaminasas
Parte del ciclo de la urea	Sintetasa del carbamoilfosfato, ornitina transcarbamilasa
Oxidación de ácidos grasos a acetil CoA	Deshidrogenasa de acil-CoA, enoil hidratasa, β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, β -cetoacil-CoA tiolasa
Protección contra el estrés oxidativo	Superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa
Procesamiento de proteínas que se importan desde el citoplasma	Proteasas para péptidos señal específicos para importar proteínas
Mantenimiento de genes y transcripción de RNA mitocondrial	DNA mitocondrial, DNA polimerasa y primasa
Síntesis de 13 componentes membranales de las proteínas de la fosforilación oxidativa	Ribosomas y el grupo de proteínas para traducir RNA.

MEMBRANAS BIOLÓGICAS Y EL TRANSPORTE SELECTIVO.

Como se mencionó anteriormente, las células eucariotas poseen además de la membrana citoplásmica, membranas internas que delimitan a los diversos orgánulos y compartimentos intracelulares. No solo actúan como barrera física al mantener la integridad y la composición celular, las membranas regulan también el tráfico de solutos entre los distintos compartimentos. Tales solutos también se acarrearán mediante sistemas de transporte específicos, a veces en contra de los gradientes electroquímicos.

A partir de los estudios cinéticos de los procesos de transporte, junto con los estudios mecanísticos es posible diferenciar dos tipos principales de estos: difusión simple y el transporte mediado. La difusión simple ocurre cuando los solutos pasan a través de la membrana sin la ayuda de algún acarreador. En cambio, el transporte mediado se produce por medio de proteínas transportadoras específicas. El transporte mediado se clasifica además en dos categorías que dependen de la termodinámica del sistema:

- 1.- *Transporte mediado pasivo o difusión facilitada.* En este proceso las moléculas son transferidas desde un compartimento donde se encuentran en alta concentración a un compartimento de concentración baja, de modo que fluyan a favor de sus gradientes.
- 2.- *Transporte activo.* En este caso las moléculas se transportan desde una baja concentración a un compartimento en donde la concentración de dichas moléculas aumenta. Es decir, el flujo va en contra de un gradiente. Tal proceso endergónico debe de acoplarse a uno suficientemente exergónico para que se lleve a cabo.

Este trabajo se centra en el transporte del primer tipo y por tanto, solo se revisa la cinética de difusión facilitada. El modelo que más se conoce es el de una proteína que para acarrear las moléculas primero forma, de un lado de la membrana, un complejo con el sustrato a transportar. Después ocurre un cambio conformacional tal que el sitio de unión se orienta hacia el otro lado de la membrana. Este modelo se denomina como *acarreador móvil*. Sus características esenciales son las siguientes:

- i) Existe un sitio específico de unión al sustrato
- ii) El sitio de unión debe alternarse entre los dos espacios exponiéndose de un lado de la membrana y después orientarse hacia el lado opuesto.
- iii) El cambio de orientación hacia cada espacio se produce por medio de un evento cinético discreto al cual se le puede asignar la constante de velocidad.

De esta forma el fenómeno de transporte mediado es un fenómeno cinético que induce un cambio de energía libre del sistema (ΔG), cuya magnitud depende de la concentraciones del soluto en ambos compartimentos y, para el caso de los iones, de la diferencia del potencial eléctrico. Estas dos dependencias se expresan cuantitativamente en términos de una función termodinámica, la cual se denomina como "potencial electroquímico" (μ). El potencial electroquímico de un soluto en un compartimento indica la energía potencial por mol de soluto en dicho compartimento (ΔG por mol). En condiciones biológicas, μ depende sólo de la concentración del soluto cargado (C) y del potencial eléctrico del compartimento ($\Delta\Psi$), cuya relación se expresa en la siguiente ecuación:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln C + ZF\Delta\Psi \quad (1)$$

Donde μ_0 es el potencial electroquímico estándar, Z el número de cargas por ion con su signo correspondiente; R es el la constante de los gases; y F la constante de Faraday (23.062 kcal Volt⁻¹mol⁻¹). Por lo tanto, el ΔG que se requiere para el paso de un mol de soluto con carga desde el compartimento "1" al compartimento "2" se da a partir de la diferencia entre los diferentes potenciales electroquímicos ($\mu_2 - \mu_1$), de acuerdo con la ecuación:

$$\Delta G = (RT \ln C_2/C_1) + ZF\Delta\Psi \quad (2)$$

Donde $\Delta\Psi$ es el potencial transmembranal. La ecuación que expresa la relación entre el $\Delta\Psi$ y las concentraciones del ion a uno y al otro lado de la membrana en situación de equilibrio ($\Delta G = 0$) es la ecuación de Nernst:

$$\Delta\Psi = (RT/ZF) (\ln C_1/C_2) \quad (3)$$

La termodinámica del transporte de calcio se comentará en los antecedentes.

ANTECEDENTES.

TRANSPORTE DE CALCIO.

En las células animales el calcio ocupa un papel fundamental en la transformación de señales provenientes del ambiente extracelular. Dicho elemento se encuentra como un segundo mensajero en el interior de la célula (Rasmussen, 1989), por lo que los cambios en la concentración del catión en el citoplasma modifican la actividad de algunas proteínas. Esto a su vez regula un conjunto de procesos celulares, tales como la motilidad (Fleischer e Inui, 1989), secreción (Lara y cols. 1997) , actividad enzimática (Enyedi y cols. 1989), etc. Las fluctuaciones de la concentración de Ca^{2+} intracelular son importantes y varían en un intervalo que va desde $0.01 \mu\text{M}$ hasta $10 \mu\text{M}$ (Hepler y Wayne, 1985), lo que significa una modificación de 3 órdenes de magnitud. Por ello, el estudio de la regulación, transporte y movilización de este catión, así como los factores que alteran dichos parámetros, resulta esencial. Por ejemplo, se sabe que dentro de la célula existen varios organelos cuyas actividades se afectan considerablemente por cambios en la concentración de calcio, siendo además capaces de incorporarlo y retenerlo en cantidades significativamente importantes. Un orgánulo susceptible de modificar su actividad enzimática por cambios en la concentración de calcio en su interior es la mitocondria. Cuando el calcio se transporta a la matriz activa a cuatro deshidrogenasas (Nichols y cols. 1995), esto induce un incremento en la concentración de NADH que se suministra a la cadena de transporte de electrones la cual incrementa el $\Delta_{\mu}\text{H}^+$ y por tanto, la fosforilación oxidativa. De esta forma, se sufraga la demanda de ATP que generalmente acompaña a los eventos celulares causados por los incrementos de Ca^{2+} citoplásmico.

Recientemente, se comenzó a reconocer el papel de este catión como modulador en las actividades metabólicas de las células vegetales. Hepler y Wayne (1985) demostraron que existen enzimas unidas a calmodulina, la cual regula la actividad de dichas enzimas por cambios conformacionales inducidos por la unión de cuatro iones de Ca^{2+} a los sitios específicos de la calmodulina. Con respecto a la relación entre los estímulos del medio ambiente y las concentraciones intramitocondriales, Roux y cols. (1981) han descrito que el movimiento de Ca^{2+} en mitocondrias de plántula de avena puede modificarse por la acción de estímulos luminosos.

La variación intracelular en la concentración del catión se induce de dos maneras:

- a) Modificando el número de canales abiertos para calcio presentes en la membrana plasmática.
- b) Modificando la salida o reteniendo el Ca^{2+} en organelos que se emplean como almacenes intracelulares de este ion, tales como el retículo endoplásmico y las vacuolas.

Respecto al último punto, existen propuestas a favor y en contra acerca de la participación de las mitocondrias en la regulación del calcio intracelular.

El transporte de Ca^{2+} a través de la membrana interna mitocondrial se lleva a cabo por un sistema de difusión facilitada que depende del gradiente electroquímico de protones ($\Delta_{\mu}\text{H}^{+}$). La eficiencia de captación en dicho organelo es tal que bajo condiciones *in vitro*, la energía libre que se almacena en forma de $\Delta_{\mu}\text{H}^{+}$ puede emplearse para captar únicamente al catión. Cerca de $3 \mu\text{mol Ca}^{2+}/\text{mg}$ proteína pueden captarse en presencia de Pi y ATP (Scarpa and Azzone, 1970).

Al emplear concentraciones fisiológicas de calcio para los análisis termodinámicos, esto es, una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{matriz}} = 200 \text{ nM}$; una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{externa}} = 100 \text{ nM}$, y un

$\Delta\Psi = 180 \text{ mV}$, el ΔG° que se obtiene al transferir un mol de Ca^{2+} desde el citoplasma a la matriz, es el siguiente:

$$\Delta G^\circ = (RT \ln [\text{Ca}^{2+}]_{\text{externa}} / [\text{Ca}^{2+}]_{\text{matriz}}) + ZF\Delta\Psi = -33 \text{ kJ/mol}$$

Cuando se compara el ΔG° de transporte con el de la hidrólisis del ATP (-46.9 kJ/mol), se observa que ambas reacciones tienen el mismo orden de magnitud y signo. Por lo tanto, en condiciones fisiológicas, el transporte de Ca^{2+} hacia la matriz es tan favorecido como lo es la hidrólisis de ATP.

EVIDENCIA Y CARACTERISTICAS DEL UNIPORTADOR.

La primera evidencia acerca del carácter electroforético del transporte de Ca^{2+} , proviene de estudios donde se observa el transporte dependiente de la oxidación de sustratos, siendo en esta condición insensible al inhibidor oligomicina. El transporte se vuelve sensible a la oligomicina cuando se emplea como energía a la hidrólisis de ATP. Esto demostró que la captación dependía directamente del $\Delta\Psi$ (Scarpa y Azzone, 1970). La captación de Ca^{2+} puede también sustentarse artificialmente por un potencial de difusión el cual se induce por la salida masiva de K^+ a través del ionóforo valinomicina (Scarpa y Azzone, 1970), con lo que se apoya la hipótesis de que el transporte de Ca^{2+} es electroforético y dependiente del $\Delta\Psi$. Respecto a la dependencia de un ambiente negativo interno, Kapus y col. (1991) reportan que se requiere de una diferencia de cargas a través de la membrana para mantener al acarreador en una conformación "competente" para el transporte. No obstante, existen reportes donde se muestra que el transporte se lleva a cabo en ausencia de un $\Delta\Psi$

pero con una diferencial entre la concentración de Ca^{2+} extramitocondrial y el de matriz (Åkerman y cols. b 1977).

Los primeros reportes acerca de si el transporte de Ca^{2+} mitocondrial estaba o no vinculado a otro transporte iónico fueron controversiales. Por ejemplo, Selwyn y cols. (1970) demostraron que tal captación no se relacionaba con ningún otro transporte iónico catalogándose como uniportador. Sin embargo, existió un cumulo de datos por parte de algunos grupos, los cuales demostraban que tal transporte era un simportador de tipo $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}^{2-}$ (Moyle y Mitchell, 1977; Day y cols, 1978). Actualmente, los estudios tienden a mostrar que el transporte de Ca^{2+} es por un uniportador (Åkerman y Nicholls, 1983; Gunter y Pfeiffer, 1990), mientras que el transporte de fosfato se lleva a cabo por un acarreador Pi/H^+ (Rossi y Lehninger, 1964; LaNoue y Schoolwerth, 1979). La estrecha dependencia de un anión permeante para el transporte de calcio se trata actualmente de explicar en términos de la baja capacidad amortiguadora que presenta la matriz mitocondrial por el calcio para compensar las cargas positivas entrantes de tal catión (menor a 10 nmol Ca^{2+} /mg proteína) (Åkerman y Nicholls, 1983; 1987).

Con respecto al estudio cinético del acarreador de calcio, las primeras mediciones de velocidad de transporte se realizaron en mitocondrias de hígado (Bygrave y cols. 1971), así como en mitocondrias de corazón (Scarpa y Graziotti, 1973). En ambos órganos se encontraron cinéticas con características cooperativas y con saturación a elevadas concentraciones de Ca^{2+} . En estudios subsecuentes se observaron variaciones en la velocidad máxima de captación ($V_{\text{max}}\text{mg}^{-1}$). En hígado por ejemplo, la $V_{\text{max}}\text{mg}^{-1}$ se encontró en un intervalo que va desde 700 hasta 1,200 nmol/ min x mg (Bragadin y cols. 1979; Hutson y cols. 1976; Vinogradov and Scarpa, 1973). En corazón se encontraron mayores V_{max} , que van desde los 400 hasta los 1,750

nmol/min x mg (McMillin-Wood y cols. 1980; Vercesi y cols. 1978). Del mismo modo, la $K_{0.5}$ que se reporta para los sistemas de mamíferos fluctúa entre 1 y 189 μM (Crompton y cols. 1976 b; Hutson, 1977; Pfeiffer y cols. 1976).

En lo que respecta a la cooperatividad del acarreador existe también controversia en los reportes. La mayoría de los estudios reportan sigmoidicidad en las velocidades de captación dependientes de la concentración de Ca^{2+} externa, interpretándose como cooperatividad positiva (Heaton and Nicholls, 1976; Reed and Bygrave, 1975; Vinogradov y Scarpa, 1973). Sin embargo, existen estudios que muestran ausencia de cooperatividad, a pesar de una modificación de las condiciones experimentales como temperatura, presencia de Mg^{2+} , o fuerza iónica (Akerman, 1977a; Akerman, 1977b; Crompton y cols. 1976b). Gunter y Pfeiffer (1990) no obstante, establecieron que para mitocondrias de mamífero el coeficiente de Hill es cercano a 2.0. Debe recordarse que un coeficiente de Hill mayor de 1 es indicativo de por lo menos dos sitios de unión para ser transportados de forma cooperativa.

En lo que respecta a los inhibidores del uniportador, estos pueden dividirse en 4 principales tipos:

- 1.- Inhibidores competitivos como son iones que pueden transportarse a través del uniportador. Tal es el caso del Sr^{2+} (Carafoli, 1965), Mn^{2+} (Baker y Schlaepfer, 1978), Ba^{2+} (Akerman y cols. 1977), Fe^{2+} (Romslo and Flatmark, 1973), Cd^{2+} (Chávez y cols. 1985) y lantánidos (Reed and Bygrave, 1974a).
- 2.- Compuestos que no se transportan, pero que interfieren con el acarreo del Ca^{2+} . Tal es el caso del Mg^{2+} a concentraciones por arriba de 3 mM (Martins y cols. 1986), poliaminas y H^+ .
- 3.- Policaciones como el RR (Rossi y Lehninger, 1964) y el cobalto de hexamina (Tashmukhamedov y cols. 1972), los cuales tienen una alta afinidad y baja K_i .

4.- Un número de agentes farmacológicos como β -bloqueadores (Noack y Freeff, 1971), guanidinas (Davidoff, 1974) y diuréticos (Gemba, 1974).

Probablemente los inhibidores más comúnmente usados son el RR (un catión hexavalente) y los lantánidos. La afinidad del uniportador de mamíferos por R.R es muy elevada ($K_i \cong 30$ nM) (Moore, 1971), así como también para el La^{3+} ($K_i \cong 20$ nM) (Reed y Bygrave, 1974 b), los cuales a dichas concentraciones no afectan alguna otra vía metabólica mitocondrial.

En lo concerniente a la naturaleza química del uniportador en mamíferos, existen diversos estudios desde la década de los setentas. Algunos grupos identificaron fracciones con actividad de transporte tanto de tipo hidrofílico (Sottocasa y cols. 1972) como de carácter hidrofóbico (Gómez-Puyou et al, 1972; Jeng y Shammoo, 1980). Más aún, existen reportes de acarreadores de Ca^{2+} con características semejantes a los de un ionóforo liposoluble, cuya actividad dependía considerablemente de la diferencia de pH existente entre la fase donadora y aceptora (Blondin, 1974; Sokolove y Brenza, 1983). Con respecto a la asignación del tamaño del acarreador, existen reportes que le designan valores desde los 3000 Daltones, hasta los 67 kDa (Jeng y cols. 1978; Zazueta y cols. 1994; Mironova y cols. 1982; Gómez-Puyou y cols., 1972; Sokolove y Brenza, 1983). Los análisis de los componentes aminoacídicos mostraron como principales residuos al aspártico, glutámico, y glutamina (Mironova y cols. 1982; Sokolove y Brenza, 1983). Existen además evidencias de que grupos sulfhidrilo de las cisteínas son importantes en la actividad (Chávez y cols. 1985). Los análisis de los componentes no aminoacídicos demuestran la presencia de fosfolípidos, azúcares neutros, y hexosaminas como compuestos que copurifican o se encuentran unidos a los acarreadores (Gómez-Puyou

y cols. 1972; Jeng y Shamo, 1980; Sokolove y Brenza, 1983; Mironova y cols. 1982).

Las estrategias que se han utilizado para la purificación del acarreador incluyen extracciones con choque osmótico que permitió conseguir una glicoproteína soluble que unía calcio (Sottocasa y cols, 1972). La utilización de diferentes tipos de solventes orgánicos, los cuales permitieron obtener distintos tipos de proteínas (calcioforos) liposolubles con propiedades de unir o aumentar la conductancia del Ca^{2+} a través de un sistema de membranas artificiales (Jeng y cols, 1978., Mironova y cols, 1982., Sokolove y Brenza, 1983). Otra estrategia fue la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Gómez-Puyou y cols, 1972., Zazueta y cols, 1994) que también permitió obtener una proteína liposoluble acarreadora de Ca^{2+} . Sin embargo, debido a las dificultades de aislar a la proteína que se involucra en dicho transporte, como es la de su escasa presencia en mitocondrias (aprox. 1 pmol/mg proteína; Reed y Bygrave, 1974b), se conoce poco acerca de sus propiedades químicas. Sin embargo, actualmente lo que más se acepta como uniportador es una proteína de bajo peso molecular (de 20 a 40 kDa) la cual no necesariamente requiere de estar relacionada con azúcares. En plantas no existen reportes acerca de la naturaleza molecular del acarreador de calcio.

Por lo anterior, se hace interesante utilizar un sistema que permita primeramente aislar el acarreador de calcio, y después manipularse genéticamente con la finalidad de incrementar su concentración. Como el manejo del material genético en plantas es más accesible que en células de mamífero, se hace atractivo el empleo de plantas para nuestro objetivo. Existen estudios sobre las características del transporte de calcio mitocondrial en distintos sistemas vegetales. En lo que respecta al tipo de acarreador, existen diferencias considerables de especie a especie. Chen y Lehninger (1973)

mostraron que las mitocondrias aisladas de algunas especies de plantas como el camote (*Impomoea batata*), la coliflor (*Brassica oleracea boitrytis*), el aguacate (*Persea gratissima*), el maíz (*Zea mayz*), y col (*Brassica olerace capitata*) requieren a un ion permeante como el fosfato para presentar la máxima captación de Ca^{2+} . Sin embargo, para el caso de la alcachofa (*Cyanara scolymus*) y del frijol mungo (*Phaseolus aureus*), esto no requirieron de Pi (Chen y Lehninger, 1973). Por otro lado, Martins y cols. (1986) muestran que en mitocondrias de maíz, el Pi no pudo sustituirse por nitrato o acetato como anión permeante. Posteriormente, el mismo grupo de Vecesi propone que el transporte de calcio en mitocondrias de maíz se realiza mediante un simportador $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}^{2-}$ (Silva y cols, 1992).

Los valores cinéticos difieren considerablemente con respecto al tipo de planta que se trate. Por ejemplo, Akerman y Moore (1983) determinaron que en el frijol mungo (*Phaseolus aureus*) la velocidad de entrada era del orden de 5 nmol/min x mg. Por otro lado, los estudios que se realizaron en maíz (*Zea mayz*) reportan una V_{max} que varía entre 140 y 165 nmol/min x mg, con una $K_{0.5}$ de 31 μM (Dieter and Marmé, 1980; Martins y cols. 1986). Respecto al grado de sigmoidicidad, Chen y Lehninger (1973) determinaron por gráficos de Scatchard sitios de afinidad para un considerable grupo de mitocondrias de plantas. De dicho estudio se obtuvo que para el caso del camote (*Impomoea batatas*), coliflor (*Brassica oleracea boitrytis*), alcachofa (*Cyanara scolymus*); col (*Brassica alerace capitata*), y cebolla amarilla (*Allium cepa*) presentaron más de un sitio de unión al calcio. Por otra parte, el maíz (*Zea mayz*), aguacate (*Persea gratissima*), y el frijol mungo (*Phaseolus aureus*) sólo presentaron un sitio de unión. Sin embargo, más recientemente el grupo de Martins (1986) determinó que el coeficiente de Hill de mitocondrias de maíz es de 2.22. Acerca de los inhibidores clásicos como el R.R y el La^{3+} se observó que en general

las concentraciones para abatir el transporte están en el intervalo micromolar. Para el caso del R.R se ha observado una $K_i = 1\mu\text{M}$ en las mitocondrias de papa (Chen y Lehninger, 1973).

Debido a que los antecedentes indican que algunas plantas presentan una actividad de transporte de calcio dependiente de una proteína acarreadora, se procedió a trabajar con un organismo que pudiera manejarse en condiciones de laboratorio. En *Phaseolus* está bien descrito el transporte de Ca^{2+} mitocondrial (Chen y Lenhinger 1968; Carnieri y cols. 1987) y existen diversas variedades de dicha especie que pueden crecer fácilmente sin condiciones especiales. El frijol de la variedad "negro Jamapa" ofrece características que lo hacen ideal para trabajar en el laboratorio, entre ellas destacan las siguientes:

- Facilidad de siembra; pues sólo requiere un soporte de algodón o papel filtro humedecido para su crecimiento. Debido a que en el primer estadio de crecimiento la semilla contiene prácticamente todos los requerimientos nutritivos para la plantula, no se necesitan soluciones especiales para regarse.
- La temperatura óptima de crecimiento para esta variedad de *Phaseolus* es de entre 25 a 30°C. En esta condición, la velocidad de crecimiento óptimo se obtiene a los ocho días posteriores a su siembra.
- No se requiere de condiciones estrictas de ambiente estéril. Sin embargo, es conveniente utilizar soportes esterilizados y cajas previamente lavadas con una solución concentrada de hipoclorito de sodio. Así mismo, las semillas deben lavarse primero en una solución diluida de cloro para debilitar la testa y después, en una solución de yoduro de potasio para eliminar a los hongos parásitos.

- El frijol "negro Jamapa" puede sembrarse en condiciones de obscuridad. Por lo que se eliminan posibles contaminaciones de cloroplastos en un extracto rico en mitocondrias.

Las características antes mencionadas permitieron obtener grandes cantidades de plántula en plazos no mayores a ocho días.

Los resultados muestran que las mitocondrias de *Phaseolus vulgaris* contienen un acarreador de Ca^{2+} de tipo electroforético y sensible a RR. La cinética de la velocidad de captación es diferente en *Phaseolus* cuando se compara con los sistemas de mamíferos. Dicho acarreador puede purificarse parcialmente de acuerdo a su punto isoeléctrico, mismo que fue similar al descrito para el uniportador de mitocondrias de riñón de rata (Zazueta, C. comunicación personal).

OBJETIVOS.

- 1.- Aíslar mitocondrias de plántula de frijol acopladas mediante un protocolo de aislamiento por centrifugación diferencial.
- 2.- Evaluar el estado de acoplamiento en las mitocondrias por medio de oximetría y de la determinación del potencial transmembranal.
- 3.- Determinar las mejores condiciones de transporte de calcio, así como las características cinéticas del acarreador de Ca^{2+} de mitocondrias de frijol mediante la técnica de filtración y el empleo del inhibidor, rojo de rutenio.
- 4.- Crear un protocolo de aislamiento para la(s) proteína(s) responsables del transporte de Ca^{2+} mediante diferentes técnicas como son: extracción por solventes orgánicos, precipitación diferencial con $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, inmunquímica e isoelectroenfoque preparativo.
- 5.- Evaluar la actividad específica de las fracciones mediante su reconstitución en proteoliposomas que formen un gradiente de H^+ .

MATERIAL Y METODOS:

MATERIAL BIOLÓGICO:

La semilla de frijol de la variedad "negro Jamapa" se esterilizó con hipoclorito de sodio al 6 % durante 5 min; posteriormente se lavó con agua destilada hasta eliminar el olor a cloro. Las semillas fueron sembradas en condiciones de obscuridad en charolas con papel filtro previamente esterilizado. La densidad de siembra fue de aprox. 150 semillas por charola. Las semillas se regaron diariamente con 500 μM de CaCl_2 . El plántula se cosechó al octavo día de siembra en el que las semillas mostraron una viabilidad del 80 %. Los cotiledones se separaron de las plántulas y de éstas se aislaron las mitocondrias.

AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS:

Después de que las plántulas se lavaron con agua destilada, se procesaron con la siguiente técnica, manteniéndose siempre el material biológico a 4°C:

- 1.- 500 g de plántulas se cortaron finamente y se colocaron en 2 litros de un medio de homogeneización hecho de 0.3 M de manitol; 1 mM de EGTA; 0.1 % de PVP 40,000 insoluble, 4 mM de cisteína, 15 mM de MOPS, y 15 mM de Trizma base a pH 7.5.
- 2.- La mezcla se homogeneizó en licuadora a 3450 rpm durante 10 seg; éste proceso se repitió una vez más.
- 3.- El homogenado se filtró dos veces con gasa y se le ajustó el pH a 7.2.
- 4.- El homogenado se centrifugó a 700 x g/10 min.
- 5.- El sobrenadante se filtró con gasa y se centrifugó a 12,000 x g/10 min para bajar la fracción mitocondrial.
- 6.- Posteriormente el botón se resuspendió en 30 ml de 0.3 M de manitol; 1 mM de EGTA; y 10 mM de HEPES pH 7.2.

- 7.- Las mitocondrias se incubaron durante 10 min con 1 mM de PMSF y 2 % de BSA delipidada.
- 8.- Al término de la incubación la mezcla se centrifugó a 700 x g/10 min y el sobrenadante se filtró con gasa. Este procedimiento se repitió una vez más.
- 9.- Posteriormente la mezcla se centrifugó a 27,000 x g/10 min, el botón se resuspendió en 200 µl de medio de resuspensión sin EGTA. La Fig. 2 muestra el procedimiento en el diagrama de flujo que se empleó para aislar la fracción mitocondrial.

DETERMINACION DEL POTENCIAL TRANSMEMBRANAL:

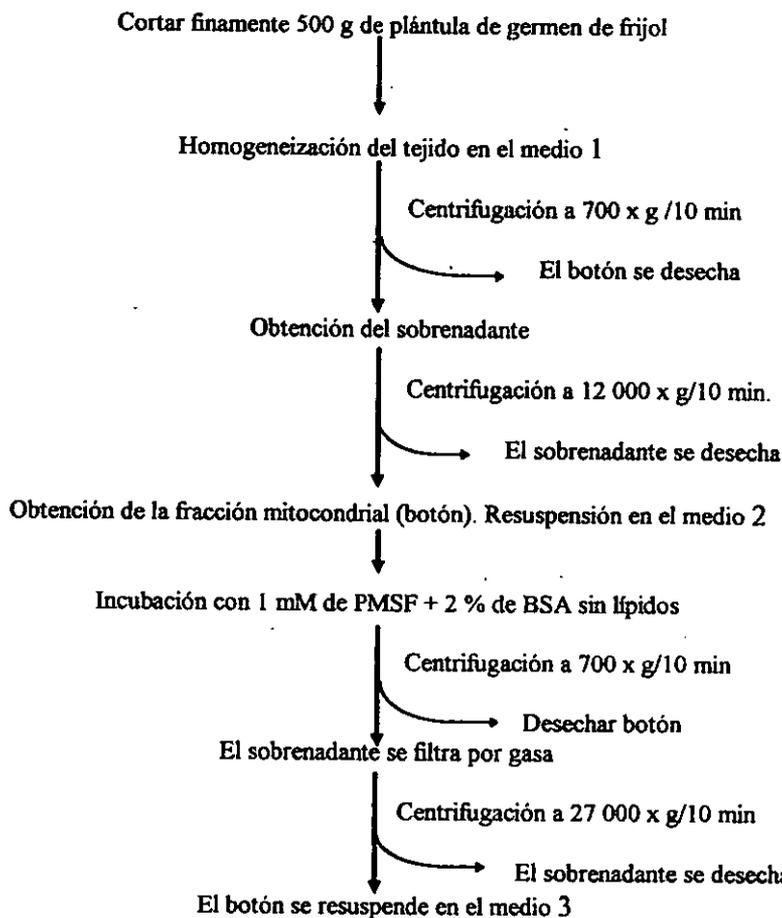
El potencial transmembranal se determinó por medio de espectroscopia de doble haz, se escogió el valor de la diferencial entre las absorbencias de las longitudes de onda a 511-533 nm del colorante safranina (15 µM) (Akerman y Wiktröm, 1976).

Las mitocondrias se añadieron en un medio compuesto de 0.3 M de manitol, 10 mM de fosfato, 2 mg de BSA deslipidada, 5 µg de rotenona, 10 mM de succinato; 2 mM de Mg²⁺, y 10 mM de HEPES pH 7.3. El volumen final fue de 3.0 ml con agitación y oxigenación constante. La temperatura fue de 25°C.

FORMACION DE MITOPLASTOS:

Las mitocondrias recién aisladas (frescas) se procesaron según el método de Thayer y Rubin (1979) de la siguiente manera:

- 1.- Las mitocondrias se resuspendieron en 0.3 M de manitol; 10 mM de succinato; 1 µg/ml de rotenona; 10 mM de Pi, 1 mM de ATP, 1 mM de Mg²⁺, 10 mM de HEPES pH 7.2. Llevar las mitocondrias a una concentración de 50 mg/ml.
- 2.- Se hizo una solución de 30-50 mg digitonina/ml DMSO.
- 3.- Se añadió digitonina a las mitocondrias en una relación de 0.065-0.07 mg digitonina/mg de proteína lentamente y con agitación a 4°C.



Medio 1: Manitol	300.0	mM	Medio 2: Manitol	300.0	mM
EGTA	1.0	mM	EGTA	1.0	mM
PVP 40 000	0.1	%	HEPES	10.0	mM
Cistefina	4.0	mM	pH	7.2	
MOPS	15.0	mM	Medio 3: Manitol	300.0	mM
Trizma base	15.0	mM	HEPES	10.0	mM
pH	7.5		pH	7.2	

Fig. 2.- Diagrama de flujo de la técnica de aislamiento de mitocondrias. El material biológico y los medio de incubación se mantuvieron a 4°C.

- 4.- Incubar 15 min con agitación y en frío. Con esto se asegura de eliminar la membrana externa sin afectar considerablemente la membrana interna.
- 5.- Las mitocondrias se diluyeron 3 veces con un medio de 0.3 M de manitol, 1% de BSA, 10 mM Hepes pH 7.2 y se centrifugaron a 12,000 g/10 min. Al botón que se obtuvo se le denominó mitoplastos. Los mitoplastos se lavaron con el mismo medio una vez más.
- 6.- Los mitoplastos se resuspendieron en un medio de 0.3 M de manitol; 10 mM Hepes pH 7.2.

OBTENCION DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES:

Las mitocondrias almacenadas a -20°C se procesaron de la siguiente manera:

- 1.- Las mitocondrias se diluyeron en un medio de manitol 0.3 M, EGTA 1 mM, y Trizma base 10 mM pH 8.6 para obtener una concentración final de 30 mg/ml.
- 2.- Aproximadamente 10 ml de las mitocondrias diluidas se rompieron en un sonicador de vástago. Se realizaron cuatro ciclos de 30 seg de sonicación a máxima intensidad por 60 seg de descanso.
- 3.- Al término de la sonicación, la suspensión mitocondrial se centrifugó a 12,000 x g/10 min.
- 4.- El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 140,000 x g/60 min.
- 5.- El sobrenadante se eliminó y el botón se resupendió en volumen mínimo de un medio formado de 0.3 M de manitol y 10 mM de HEPES pH 7.2.
- 6.- Las PSM se almacenaron en alícuotas de 200 a 500 μl a -72°C .

OXIMETRIA:

El consumo de oxígeno se determinó polarográficamente con un electrodo tipo Clark y un oxímetro YSI-5300. Quinientos μg de proteína mitocondrial se añadieron a un medio de 0.3 M de manitol, 10 mM de fosfato, 2 mg de BSA delipidada, 5 μg de

rotenona, 10 mM de succinato, 2 mM de Mg^{2+} , y 10 mM de HEPES pH 7.3. El volumen final fue de 1.8 ml con agitación constante. La oximetría se llevo a cabo a 25 °C. La concentración de oxígeno en el medio de respiración se consideró de 400 nanoátomos gramo/ml. El cero porciento de oxígeno se obtuvo titulando con ditionita.

DETERMINACION DEL TRANSPORTE DE CALCIO EN MITOCONDRIAS:

Para la determinación del transporte se determinó la captación de $^{45}Ca^{2+}$ con la técnica de filtración, que consistió de los siguientes pasos:

- 1.- La proteína mitocondrial se añadió a un medio cuyo contenido y condiciones experimentales se describe individualmente en cada figura.
- 2.- Al término del tiempo de incubación, se tomaron alícuotas de 0.2 ml y se depositaron en filtros Millipore (diámetro de poro de 0.45 μm) humedecidos previamente con 10 ml de H_2O dest.
- 3.- Inmediatamente después los filtros se lavaron con 5 ml de $CaCl_2$ 10 mM para eliminar el $^{45}Ca^{2+}$ adherido inespecíficamente a las mitocondrias.
- 4.- Los filtros se colocaron en viales de vidrio de 20 ml y se les agregaron 5 ml de líquido de centelleo. Los viales se dejaron incubar toda la noche para permitir que los filtros se disolvieran completamente.
- 5.- Las cpm se estimaron en un contador de centelleo líquido.

FORMACION DE PROTEOLIPOSOMAS:

Los proteoliposomas se formaron por medio de la técnica reportada por Ramírez y col. (1987) que consiste en lo siguiente:

- 1.- La asolectina que previamente se purificó con acetona y se disolvió en éter se secó con nitrógeno. Posteriormente se disolvió en un amortiguador de 50 mM H_3PO_4 -TEA pH 7 para dar una concentración final de 50 mg/ml. A esta mezcla se le denominó suspensión de asolectina.

- 2.- Después de disolverse perfectamente, la solución de asolectina se dispersó con un sonicador de vástago a 4°C y en ambiente de nitrógeno hasta claridad. De esta forma, la asolectina se encontraba lista para poder incorporar a la citocromo oxidasa (Cyt aa₃).
- 3.- La suspensión de asolectina sonicada se mezcló con la citocromo oxidasa para dar una concentración final de 250 µg Cyt aa₃/ml solución.
- 4.- Los lípidos junto con la Cyt aa₃ se incubaron 15 min a 30°C. A esta última mezcla se le denominó proteoliposomas.
- 5.- Para agrandar los proteoliposomas se congelaron con nitrógeno líquido y se descongelaron lentamente con agua-hielo.
- 6.- Los proteoliposomas se llevaron a un volumen de 20 ml con el amortiguador inicial y se centrifugaron a 250 000 x g/60 min a 4°C.
- 7.- El botón se resuspendió en 300 µl de amortiguador. El porcentaje de incorporación de Cyt aa₃ a los liposomas, evaluado por cuantificación de proteína con el método de Lowry (1951) fue del 100 % .
- 8.- Los proteoliposomas se guardaron a -72°C hasta su empleo. La descongelación se realizó lentamente en agua-hielo. Es importante advertir que después de descongelar los proteoliposomas, se deben sonicar durante 3 seg para obtener el mejor grado de acoplamiento.
- 9.- Para determinar el grado de acoplamiento de la Cyt aa₃ se determinó el consumo de oxígeno en presencia y ausencia del desacoplante CCCP. El medio de reacción fue de amortiguador de fosfatos 50 mM/TEA pH 7.0, 7.5 mM de ascorbato, 0.75 mM de TMPD (fresco), y una solución fresca de 2.5 mM de citocromo C soluble tipo VI de corazón de equino. La determinación se realizó a 30°C.

INCORPORACION DE PROTEINAS MITOCONDRIALES A PROTEOLIPOSOMAS:

Una vez obtenidos los proteoliposomas, las proteínas de membrana mitocondrial se incorporaron de la siguiente manera:

- 1.- Aproximadamente 2 mg de proteína mitocondrial fueron disueltas en 250 μ l de un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7 junto con 0.5 % de colato de sodio.
- 2.- La mezcla se centrifugó a 100 000 x g/30 min para eliminar el material insoluble.
- 3.- El sobrenadante se mezcló con 300 μ l de proteoliposomas previamente agrandados y se sonicaron suavemente durante 3 seg.
- 4.- Los liposomas se dializaron toda la noche en 500 ml de KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0
- 5.- Después de la diálisis, los liposomas se pasaron por una columna de sephadex G-50 de grano medio para separar los liposomas de diferentes tamaños. En los experimentos de transporte de Ca^{2+} se emplearon los liposomas de mayor tamaño.

TRANSPORTE DE CALCIO EN PROTEOLIPOSOMAS.

El transporte de calcio se determinó mediante el empleo del isótopo radioactivo $^{45}\text{Ca}^{2+}$ con una modificación de la técnica de filtración:

- 1.- Aproximadamente de 50 a 100 μ l de proteoliposomas se agregaron a un medio de incubación que consistió de 7.5 mM de ascorbato, 0.75 mM de TMPD (fresco), y una solución fresca de 2.5 mM de citocromo C soluble tipo VI de corazón de equino, 500 μ M de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (act. sp. 1000 cpm/nmol), 50 mM de Pi/TEA, pH 7.0 a 30°C. El volumen final fue de 1 ml
- 2.- Al término de la incubación, la reacción se detuvo agregando 200 μ l de sulfato de protamina (4 mg/ml).
- 3.- Inmediatamente después se tomó una alícuota de 200 μ l y se filtró en filtros millipore de 0.45 μ m de diámetro previamente humedecidos.

- 4.- Los filtros se lavaron con 5 ml de una solución de CaCl_2 10 mM para lavar el $^{45}\text{Ca}^{2+}$ pegado inespecíficamente.
- 5.- Los filtros se colocaron en viales de vidrio de 20 ml y se agregaron 5 ml de líquido de centelleo. Los viales se dejaron toda la noche para permitir que los filtros se disolvieran completamente.
- 6.- Las cpm se estimaron en un contador de centelleo líquido. La captación total de calcio de los proteoliposomas se obtuvo después de restarse las cpm de un grupo control (sin TMPD/Ascorbato) que se incubó paralelamente con el experimental.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA MONOAMINO OXIDASA.

La determinación de la enzima Monoamino oxidasa se emplea como marcador de membrana externa mitocondrial (Darley-Ursmar y col. 1987). Al formar mitoplastos es necesario determinar la disminución de la actividad de tal enzima. El ensayo se basa en la oxidación de la benzilamina a benzaldehído por la MAO, dando un incremento en la absorbencia a 250 nm (Darley-Ursmar y col. 1987):

- 1.- Se preparó una solución stock de 0.25 M de benzilamina y se diluyó la proteína a 1 mg/ml en 50 mM de fosfato de sodio pH 7.5.
- 2.- Se añadieron 0.8 ml de amortiguador de Pi/Na^+ a una cubeta de cuarzo y 10 μl de la solución estándar de benzilamina. La línea base se graficó a 250 nm con una sensibilidad de 0.3 de absorbencia y una velocidad de 1 min/ml.
- 3.- Para arrancar la reacción se añadió proteína a una concentración final de 0.01-0.05 mg/ml y se midió el incremento de absorbencia. En el curso temporal el aumento de absorbencia fue lineal.
- 4.- La actividad específica fue calculada usando un coeficiente de extinción de 13/cm x mM a 250 nm para el benzaldehído.

ESQUEMA DE PURIFICACION DEL ACARREADOR DE CALCIO:

Para la obtención de la fracción rica en actividad de transporte, se utilizó primero un método de precipitación fraccionada, para posteriormente aplicar una de las fracciones a una columna de inmunoafinidad. A continuación se enumeran los pasos empleados en el esquema de purificación (fig. 3):

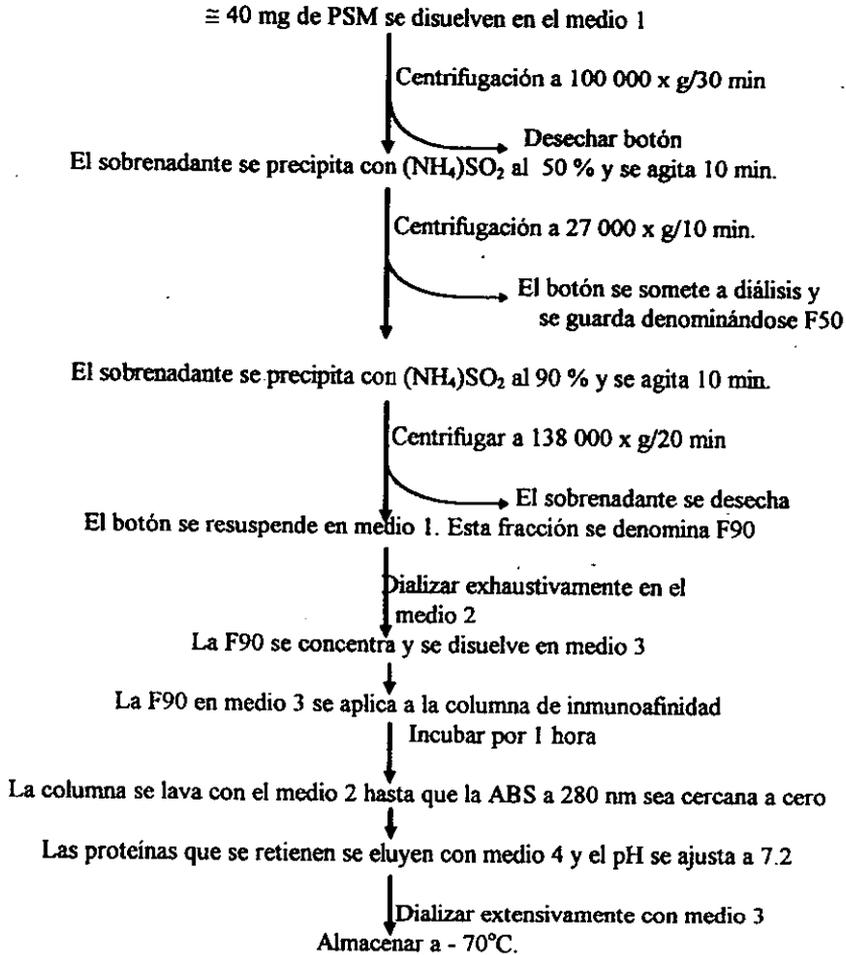
- 1.- Aproximadamente 40 mg de PSM se disolvieron en 20 ml de Medio 1 (0.3 M de manitol, 1 mM de EGTA, 1.0 % de colato de sodio, 10 mM de Trizma base, pH 7.2). La mezcla se agitó suavemente a 4°C.
- 2.- La mezcla se centrifugó a 100 000 x g/30 min para eliminar los precipitados que no se disolvieron.
- 3.- El sobrenadante se precipitó con $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$ al 50 %. La mezcla se agitó durante 10 min y se centrifugó a 27 000 x g/10 min.
- 4.- El botón fue desechado y el sobrenadante se precipitó con $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$ al 90 %. La mezcla se agitó durante 10 min.
- 5.- La mezcla se centrifugó a 138 000 x g/20 min. El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en medio 1.
- 6.- La mezcla posteriormente se sometió a diálisis exhaustivamente contra el medio 2 (125 mM de KCl, 1 mM de EGTA, y 10 mM de Trizma base, pH 7.2). A la fracción precipitada con 90 % de sulfato de amonio se le denominó F90.
- 7.- La mezcla se concentró y resuspendió en aproximadamente 1.0 ml del medio 3 (CHAPS 0.1 %, y 10 mM de Trizma base pH 7.2.)
- 8.- La fracción F90 fue pasada por la columna de inmunoafinidad previamente equilibrada con 5 volúmenes de medio 3. La fracción se dejó incubando por una hora y posteriormente se lavó con medio 3 hasta que la absorbencia a 280 nm del lavado fue de cero.

- 9.- Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas con medio 4 (0.3 % de CHAPS y 150 mM de citrato de sodio pH 6) a una velocidad de 0.2 ml/min.
- 10.- A las proteínas eluidas se les amortiguó inmediatamente el pH a 7.2 con Tris-HCl ó Tris-KOH según se requiriera.
- 11.- La fracción retenida por la columna de inmunoafinidad se sometió a una diálisis intensiva contra el medio 3 y se almacenó a - 70°C hasta su empleo.

ISOELECTROENFOQUE PREPARATIVO DE FASE ACUOSA.

El isoelectroenfoque a partir de PSM se llevó a cabo de la siguiente manera:

- 1.- Aproximadamente 13 mg de PSM fueron diluidas e incubadas durante 10 min con agitación suave en 20 ml de una solución con 500 mM de KCl, 15 mM de DTT, 10 mM de MOPS pH 7.2. Todo el procedimiento descrito se llevó a cabo a 4°C.
- 2.- Inmediatamente después de sonicarse a claridad la mezcla fue centrifugada a 250 000 x g/40 min.
- 3.- Las PSM se resuspendieron en 20 ml de una solución con 15 mM de DTT, 50 % de glicerol, y 1 mM de MOPS pH 7.2.
- 4.- Las PSM fueron nuevamente sonicadas a claridad y se centrifugaron a 250 000 x g/40 min.
- 5.- El botón se resuspendió en 48 ml de 1 % de CHAPS, 2% de anfólinas (pH 3-10) y 3 % de glicerol.
- 6.- Las PSM se incubaron durante 30 min y después se sometieron a sonicación hasta alcanzar la claridad.
- 7.- Inmediatamente después de la sonicación, la mezcla se aplicó a un sistema de isoelectroenfoque preparativo.
- 8.- El isoelectroenfoque se llevó a 12 Watts constantes durante 6 hrs. El voltaje y amperaje final fueron de 1000 Volts y de 10 mAmps respectivamente.



Medio 1.-	Manitol 300.0 mM	Medio 2.-	KCl 125 mM
	EGTA 1.0 mM		EGTA 1.0 mM
	Colato de Na ⁺ 1.0 %		Trizma base 10.0 mM
	Trizma base 10.0 mM		pH 7.2
	pH 7.2		
Medio 3.-	CHAPS 0.1 %	Medio 4.-	CHAPS 0.3 %
	Trizma base 10.0 mM		Citrato de sodio 150 mM
	pH 7.2		pH 6.0

Fig. 3.- Esquema de purificación que se empleó en el aislamiento del acarreador de Ca²⁺ de mitocondrias de plántulas de frijol.

- 9.- Al término de la corrida, se cosecharon 20 muestras.
- 10.- A las muestras se les determinó el pH y posteriormente se les ajustó a 7.0 con KOH o HCl.
- 11.- Una vez amortiguado el pH de las muestras, se determinó la absorbencia a 280 nm.
- 12.- Las muestras que presentaban la misma media unidad de pH se incubaron en 1 M de NaCl durante 1 hr, se sometieron posteriormente a diálisis exhaustiva en 1 mM de MOPS pH 7.2
- 14.- Las muestras se congelaron a - 70°C y se liofilizaron. Posteriormente se almacenaron a - 20°C hasta su empleo.

PRODUCCION DE ANTICUERPOS EN GALLINA.

La técnica de elaboración y extracción de anticuerpos en yema de huevo (IgY) se hizo mediante la modificación de un método reportado por el grupo de Polson (1980).

- 1.- Una gallina de la línea *Delb-Kan Warren* se inoculó una vez cada semana con 40 µg de FR + 1 ml de Adyuvante completo de Freud hasta completar 3 dosis.
- 2.- Al término del período de inoculación, los huevos fueron recolectados y almacenados a 4°C hasta su procesamiento. Cada huevo se procesó por separado.
- 3.- Las claras se separaron de las yemas y a estas últimas se les retiró la membrana vitelina.
- 4.- Las yemas se disolvieron en un volumen igual de PBS (0.01 % NaN₃, 100 mM de NaCl y 10 mM de Na₃PO₄ pH 7.5).
- 5.- A la mezcla se añadió polietilén glicol 8,000 pulverizado (PEG-8000) hasta una concentración final de 3.5 % (p/v). Este proceso se llevo a cabo a temperatura ambiente.
- 6.- La mezcla se agitó durante 30 min a temperatura ambiente.

- 7.- Al término de la incubación, la mezcla se centrifugó a 23,000 g/10 min para eliminar las proteínas que se precipitaron.
- 8.- El botón se desechó y el sobrenadante se pasó dos veces por un embudo con tapón de algodón.
- 9.- Al filtrado que se obtuvo se le añadió PEG-8000 hasta tener una concentración final del 12 % para precipitar los anticuerpos.
- 10.- Una vez que el polímero se disolvió completamente, la mezcla se centrifugó a 12,000 g/10 min.
- 11.- El botón resultante se resuspendió en PBS en el volumen original de la yema de huevo.
- 12.- Al homogenado se le añadió $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ para tener una concentración final de 2M.
- 13.- La mezcla se agitó durante 30 min a 4°C y posteriormente se centrifugó a 12,000 g/10 min.
- 14.- El botón que se obtuvo se resuspendió en PBS, se sometió a diálisis exhaustiva contra PBS y se concentró.
- 15.- Las IgY se almacenaron a 4°C hasta su empleo.

TITULACION DE ANTICUERPOS POR MEDIO DEL ENSAYO DE INMUNOABSORCION POR ENZIMA UNIDA (ELISA):

La técnica de ELISA se realizó a partir de la modificación de Engvall y col. (1971) de la siguiente forma:

- 1.- En una placa de microtitulación se agregó, a cada pozo, cantidades en nanogramos de antígeno disueltos en 100 μl de 0.05 M de carbonato de Na^+ pH 9.6. El antígeno se incubó por 24 hrs a temperatura ambiente.
- 2.- La placa se bloqueó con 300 μl de 0.01 % de gelatina de cerdo y se incubó durante 2 hrs.

- 3.- Las placas se lavaron 6 veces con PBS-Tween (0.01 M de fosfato de Na^+ pH 7.5, 0.1 M de NaCl, 0.01 % de NaN_3 , y 0.1 % de Tween 20) y después 6 veces con H_2O bidestilada.
- 4.- Las placas se secaron y se añadió a cada pozo IgY solubilizada en PBS. Las diluciones comenzaron a partir de 1:400 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se continuaron con diluciones sucesivas de 1:800; 1:1,600; 1:3,200; 1:6,400; 1:12,800.
- 5.- Las placas se incubaron durante 45 min a 38°C y con agitación constante.
- 6.- Las placas se lavaron 6 veces con PBS-Tween y posteriormente 6 veces con H_2O bidestilada .
- 7.- Las placas se secaron y se añadieron 100 μl por pozo de un antiIgY-streptavidina/peroxidasa a una dilución con PBS-Tween de 1:30,000. Las placas se incubaron durante 45 min a 38°C con agitación constante.
- 8.- Se repitió el procedimiento número 3.
- 9.- Las placas se secaron y se revelaron con 100 μl de solución reveladora (24 mM de citrato, 50 mM de fosfato dibásico de Na^+ , 3.7 mM de o-fenilendiamina, y 1.3 mM de peróxido de hidrógeno) a pH 4.0. Las placas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y agitación constante.
- 10.- Al término de la incubación se añadieron a cada pozo 50 μl de 2 M de H_2SO_4 .
- 11.- Las placas se analizaron en un lector de ELISA a doble longitud de onda de 490-630 nm.

RESULTADOS.

Respirometría y Determinación de Potencial Transmembranal:

El transporte de Ca^{2+} mitocondrial en eucariontes es electroforético, por lo tanto era primero necesario asegurarse de que la técnica que se empleó para aislar las mitocondrias de plántula de frijol generara el gradiente electroquímico que sustentase tal acarreo. Un método de evaluación que permite obtener información sobre la formación del $\Delta_p\text{H}^+$ en el orgánulo aislado, es la oximetría. Al determinar la respiración en mitocondrias de plántula de frijol, se encontró que dichos orgánulos eran capaces de fosforilar oxidativamente al ADP, cuando se utilizó como sustrato oxidable al succinato (Fig. 4). Al adicionar ADP, la velocidad de consumo de oxígeno se estimuló calculándose un control respiratorio (CR) de 2.3. Siempre que se adicionaba un pulso de ADP (150 nmol) a las mitocondrias, fue posible calcular el CR. La ADP/O que se estimó para la fosforilación en presencia de succinato fue de 1.82. Sin embargo, a pesar de que las mitocondrias se encontraban acopladas, la respiración no se estimuló por la adición de Ca^{2+} (Fig. 4). Es importante advertir que para obtener mitocondrias de plántula de frijol acopladas, se requiere de la presencia de Mg^{2+} a concentraciones milimolares en el medio de respiración. Tomando en cuenta que en mamíferos el Mg^{2+} es un inhibidor que interfiere con el transporte que se lleva al cabo por el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (Martins y col. 1986), por ello, debe considerarse la posibilidad de que en nuestras condiciones de oximetría el uniportador se encontraba inhibido.

Con el fin de obtener más información sobre el estado energético mitocondrial, se evaluó espectrométricamente el $\Delta\Psi$ (Fig. 5). El estudio mostró que en presencia de un sustrato oxidable se generaba una diferencia de voltaje a través de la membrana interna de los orgánulos, sensible al desacoplante CCCP. Tal potencial fue semejante en magnitud al que se genera en mitocondrias de mamíferos (Reyes-Vivas y col. 1996). No obstante, la adición de 50 a 300 μM de Ca^{2+} en el medio de reacción no indujo una despolarización transitoria en las mitocondrias (Fig. 5).

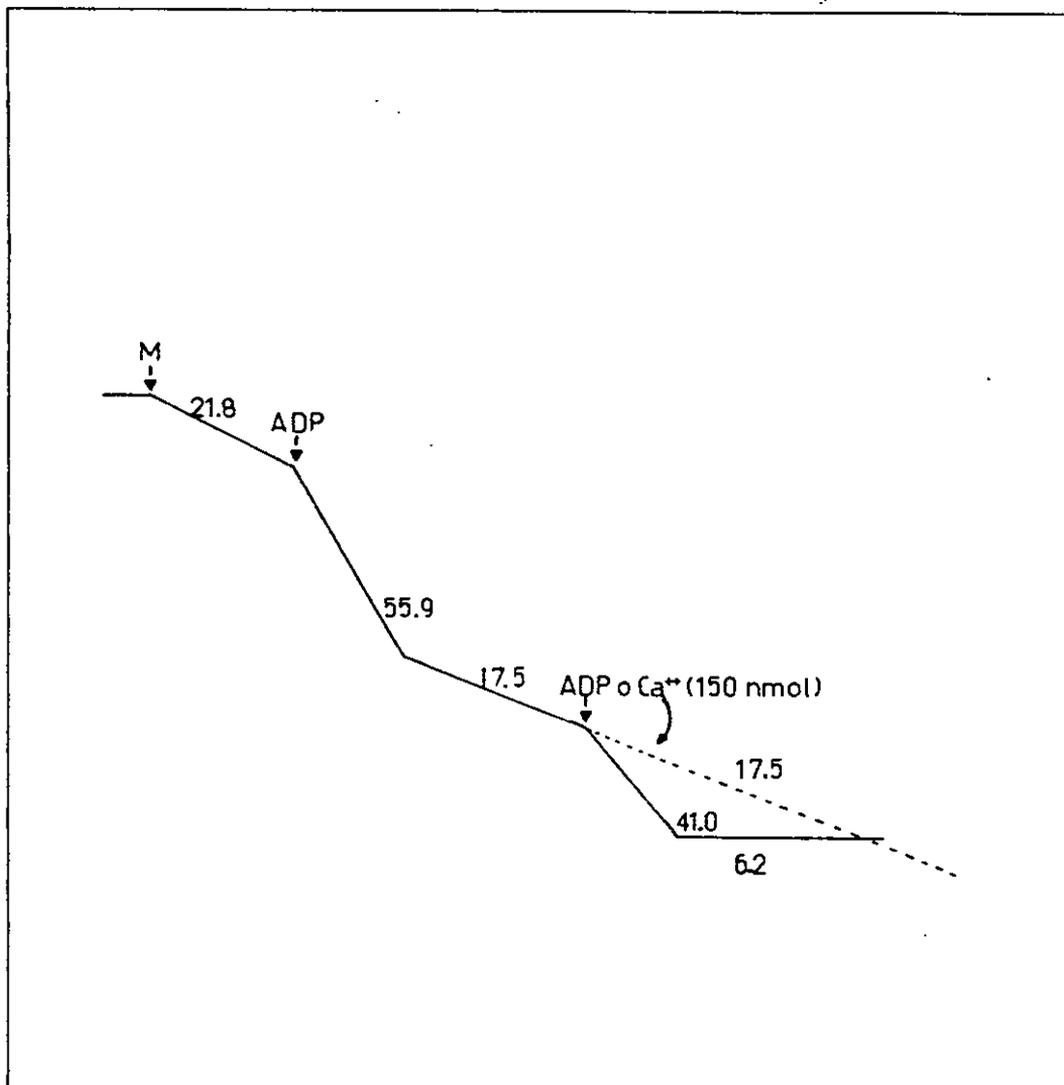


Fig. 4.- Trazo respiratorio representativo de mitocondrias de germen de *Phaseolus vulgaris*. Cuando se indica, se adicionaron 150 nmol de ADP o Ca²⁺. Los números corresponden a los nanoátomos de oxígeno consumidos/min/0.5 mg. Las condiciones experimentales se describen en Material y Métodos.

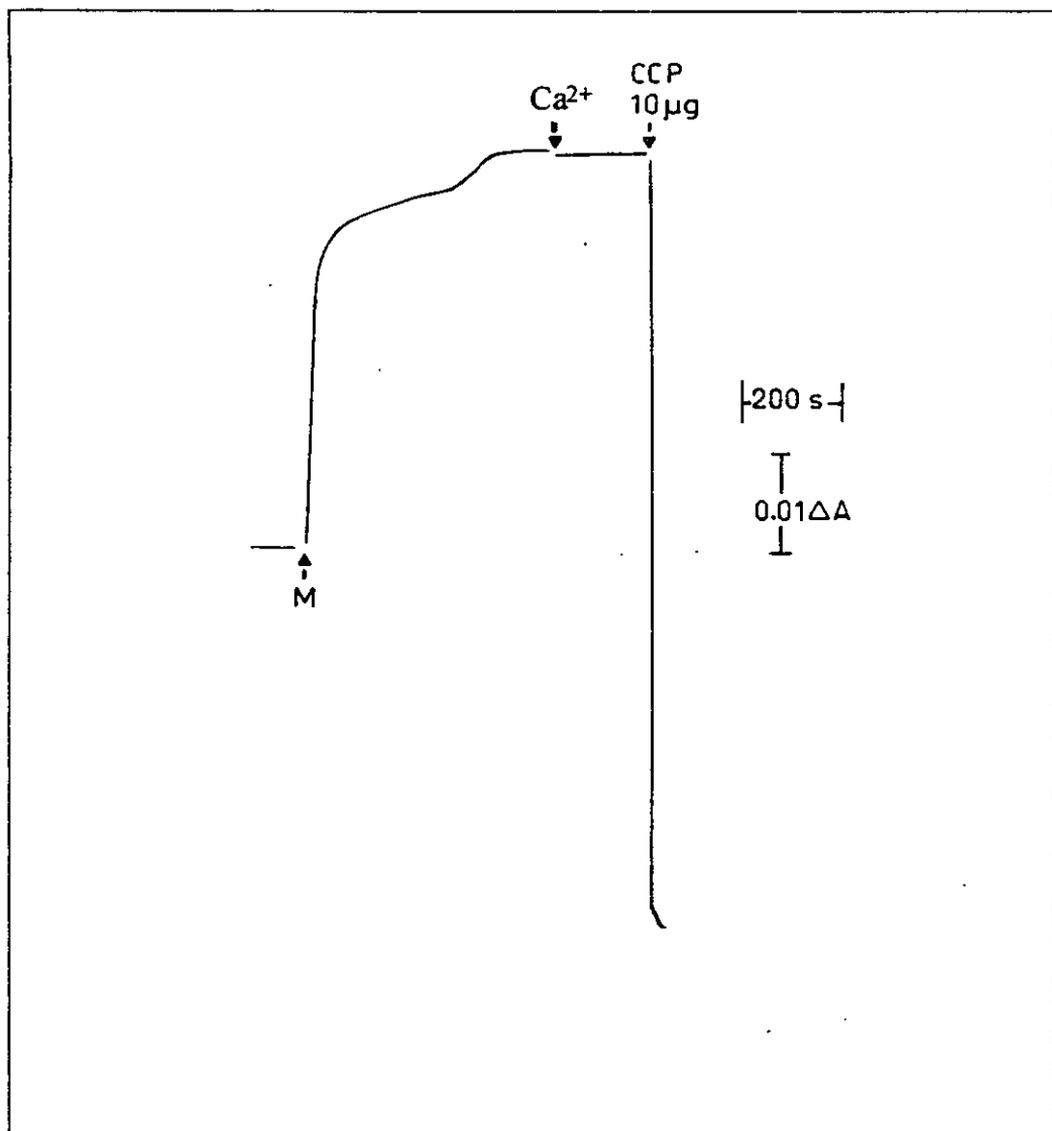


Fig.5.- Trazo representativo de un potencial membranal, de mitocondrias de plántula de frijol. Dos mg de proteína mitocondrial (M) se añadieron a un medio y a las condiciones descritas en Material y Métodos. Cuando se indica, el calcio se añadió a una concentración de 50 ó 300 μM . La adición de 10 μg del desacoplante CCCP se utilizó para evaluar el $\Delta\Psi$ total que se formó.

Los resultados obtenidos en la oximetría y en la determinación del $\Delta\Psi$ muestran que el transporte de Ca^{2+} no modifica el estado energético mitocondrial. Lo anterior puede interpretarse de tres maneras: a) las mitocondrias de plántula de frijol no transportan Ca^{2+} b) el transporte de calcio en mitocondrias de plántula de frijol no es electroforético y, por tanto, es independiente del estado energético del orgánulo; c) el transporte de Ca^{2+} es más lento que el bombeo de H^+ de la cadena de transporte de electrones, por lo que la entrada del calcio a la matriz no disminuye sensiblemente las cargas negativas. En estas circunstancias, ni el $\Delta\Psi$ ni la respiración se alterarían significativamente.

Por tanto, fue necesario determinar el transporte del catión por un método más directo que permitiera, además, obtener información cinética sobre el acarreador. El primer método que se decidió utilizar fue el espectrofotométrico, por medio de la evaluación de los cambios en la absorbencia del colorante metalocrómico Arsenazo III (Kendrick, 1976). Sin embargo, no fue posible determinar los flujos del catión por esta técnica debido a la alta concentración de Ca^{2+} externo requerido para que el calcio se transportara hacia la matriz. El transporte del catión tampoco pudo observarse con el empleo de otros colorantes específicos y de K_D mayores como la murexida, debido a su baja sensibilidad. Por lo anterior fue necesario utilizar el isótopo radioactivo del calcio.

Transporte de calcio radioactivo mitocondrial:

La determinación del transporte de calcio se realizó empleando el isótopo radioactivo $^{45}\text{Ca}^{2+}$. La cinética se determinó bajo diferentes condiciones de incubación (Fig. 6). Cuando en el medio se encontraba presente 10 mM de P_i la captación máxima de calcio se alcanzaba, aproximadamente, a los 5 min (50 nmol Ca^{2+} /mg). El tiempo que se requirió para alcanzar el estado estacionario es cinco veces mayor que en mitocondrias de mamífero (Reyes-Vivas y col. 1996). Por otra parte, de modo similar a lo que ocurre en mitocondrias de *Euglena gracilis* (Uribe y col. 1994), la adición de ADP en un intervalo que fue desde 200 μM hasta 600 μM no elevó

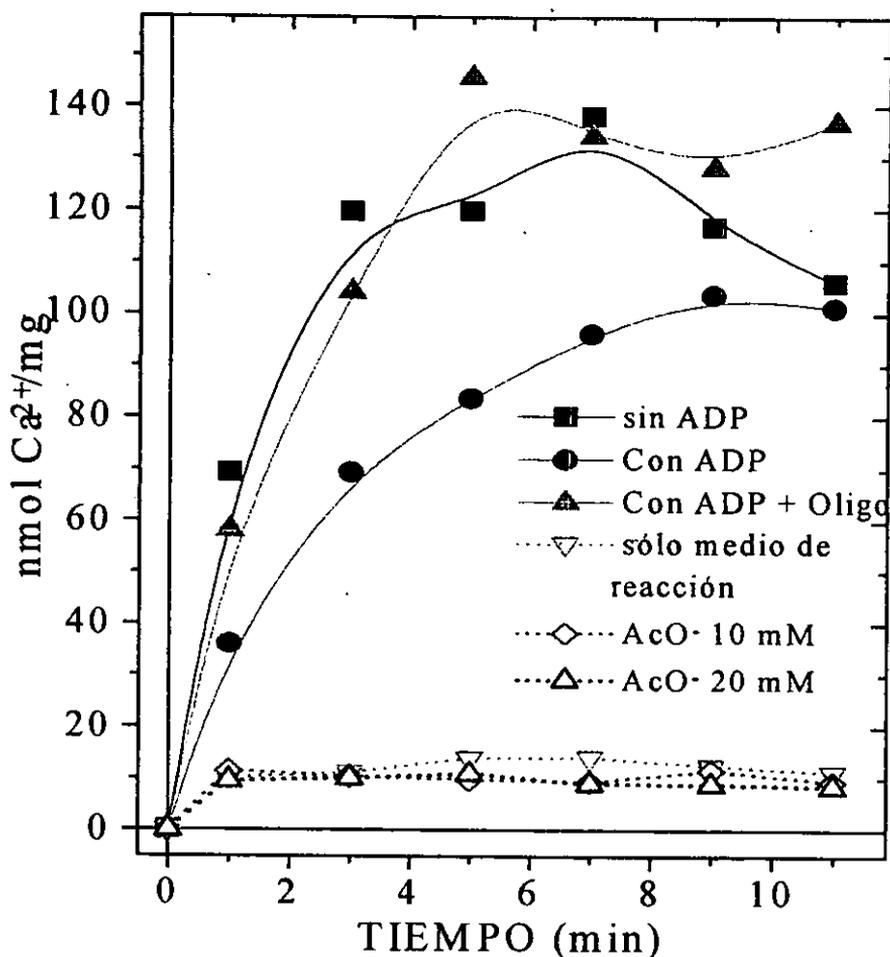


Fig. 6.- Medición del transporte de Ca^{2+} en distintas condiciones de incubación. En todas las condiciones las mitocondrias (0.66 mg) se añadieron a un medio de reacción de 0.3 M de manitol, 10 mM de succinato, 2 μg de rotenona, 2 mg de BSA sin lípidos, 300 μM de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (activ. esp. 1000 cpm/nmol), y 10 mM de HEPES pH 7.2. En donde se indica se añadió 600 μM de ADP, 5 μg de oligomicina, 10 mM o 20 mM de AcONa^+ . Los trazos en línea continua representan experimentos en presencia de 10 mM de fosfato. Los trazos en línea discontinua representan experimentos en ausencia de Pi en el medio. El medio se oxigenó y agitó constantemente, y la temperatura se mantuvo a 25°C. El vol. final fue de 1.0 ml.

significativamente la captación del catión (resultados no mostrados). El transporte requiere de la presencia de Pi como anión permeante; y no pudo sustituirse ni por 10 mM de nitrato, ni por 10 ó 20 mM de acetato (Fig. 6), lo cual coincidió con lo reportado para mitocondrias de otros sistemas vegetales (Martins y col. 1986).

La dependencia de la captación de Ca^{2+} a diferentes concentraciones de calcio externo mostró una cinética sigmoidea (Fig. 7). Al ajustar los datos a la ecuación de Hill se obtuvo un coeficiente de Hill de 1.75 ± 0.38 . Cabe destacar que a concentraciones de calcio externo por arriba de $600 \mu\text{M}$ la captación del catión decrece significativamente. Lo anterior puede deberse a un aumento en la permeabilidad inespecífica de la membrana mitocondrial por sobrecarga de Ca^{2+} (Chávez y col. 1989). El ajuste de los datos por el método que antes se menciona permitió también determinar que la $K_{0.5}$ es de $115.55 \pm 17.51 \mu\text{M}$ y que la velocidad máxima de captación ($V_{\text{max}}\text{mg}^{-1}$) es de $38.37 \pm 3.16 \text{ nmol/mg/min}$ (Fig. 7). Para corroborar el valor de cooperatividad que se obtuvo a partir de la ecuación Hill, se decidió determinar dicho valor mediante un regráfico de Hill (Segel, 1975) obteniéndose una $h = 1.89 \pm 0.1$ (Fig. 8).

Una vez obtenidos los parámetros cinéticos se decidió determinar si el transporte de calcio en mitocondrias de plántula de frijol era sensible al R.R, inhibidor clásico del uniportador. Tal policación demostró ser un inhibidor no competitivo de la entrada de calcio en mitocondrias, sin afectar alguna otra vía metabólica mitocondrial (Reed and Bygrave, 1974 b) (Fig. 9). Los resultados mostraron que a partir de una actividad de $161 \text{ nmol Ca}^{2+}/\text{mg}/3 \text{ min}$, la presencia de $30 \mu\text{M}$ de R.R disminuyó el transporte a $13.07 \text{ nmol Ca}^{2+}/\text{mg}/3 \text{ min}$. Lo anterior significó un decaimiento de la actividad de aproximadamente 91.8 %.

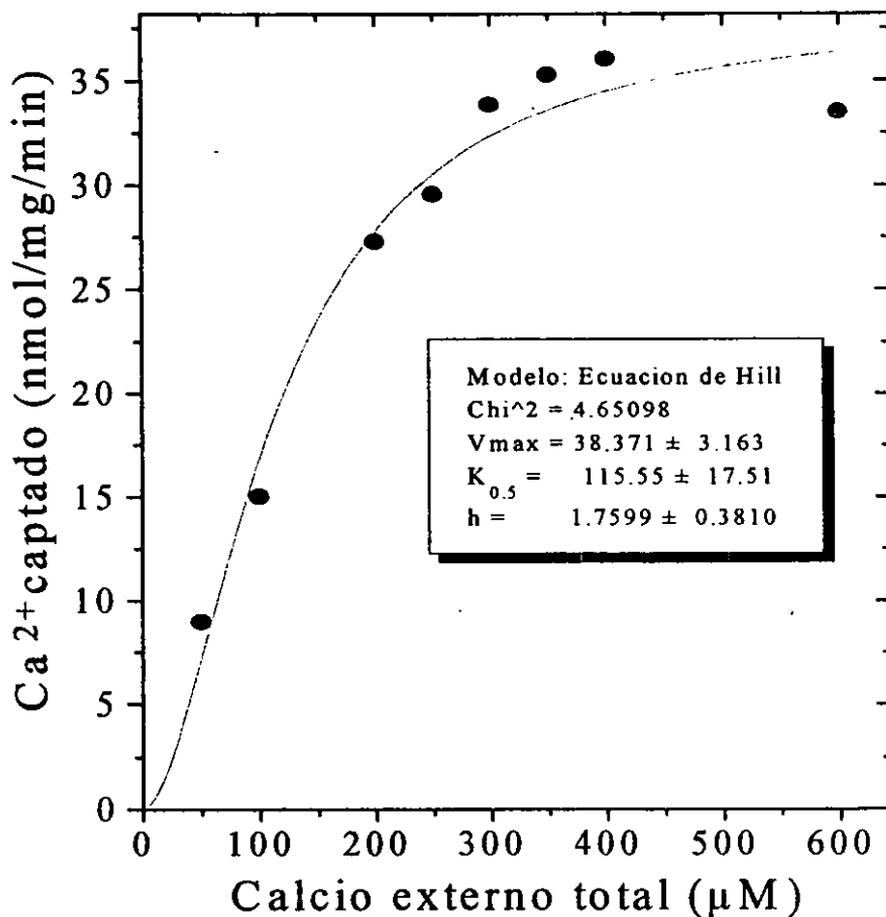


Fig. 7.- Cinética del transporte de calcio mitocondrial. Dos mg de mitocondrias se añadieron a un medio de incubación formado de 0.3 M de manitol; 10 mM de succinato; 10 mM de Pi; 5 µg de rotenona; 10 mM de HEPES pH 7.2. El medio (3 ml) se oxigenó y agitó constantemente, con una $T = 25^{\circ}\text{C}$. La actividad específica del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fue de 1000 cpm/nmol. Las constantes se obtuvieron del ajuste de los datos a la ecuación de Hill.

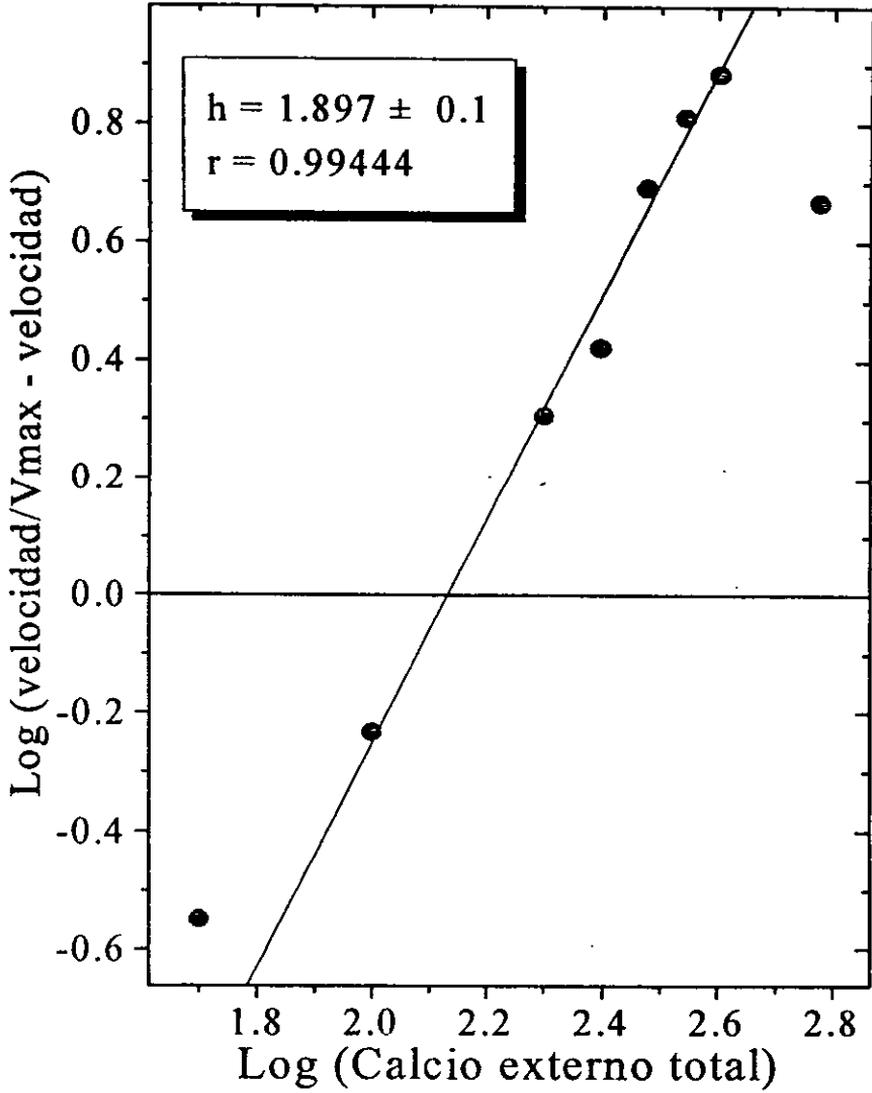


Fig 8.- Re gráfico de Hill de las velocidades iniciales de transporte de Ca^{2+} en mitocondrias de *Phaseolus vulgaris*. El gráfico se realizó a partir de los datos de la Figura 7.

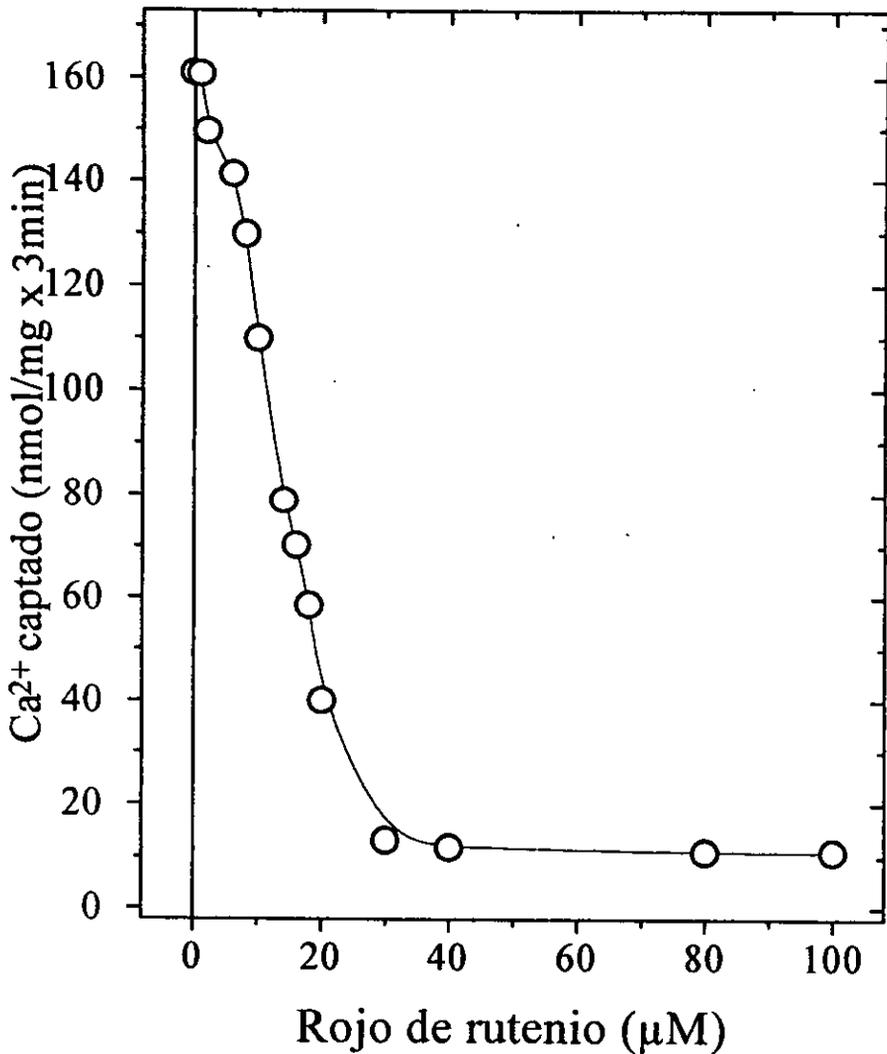


Fig. 9.- Inhibición de la captación de Ca^{2+} por rojo de rutenio. 2 mg de proteína mitocondrial se añadieron a un medio que contenía 0.3 M de manitol, 10 mM de succinato, 10 mM de Pi, 5 μg de rotenona, y 10 mM de HEPES pH 7.2. El medio se oxigenó y agitó constantemente a 25°C. La actividad del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fue de 1000 cpm/nmol. El volumen final fue de 3 ml.

Aislamiento del acarreador de calcio de mitocondrias de plántula de frijol:

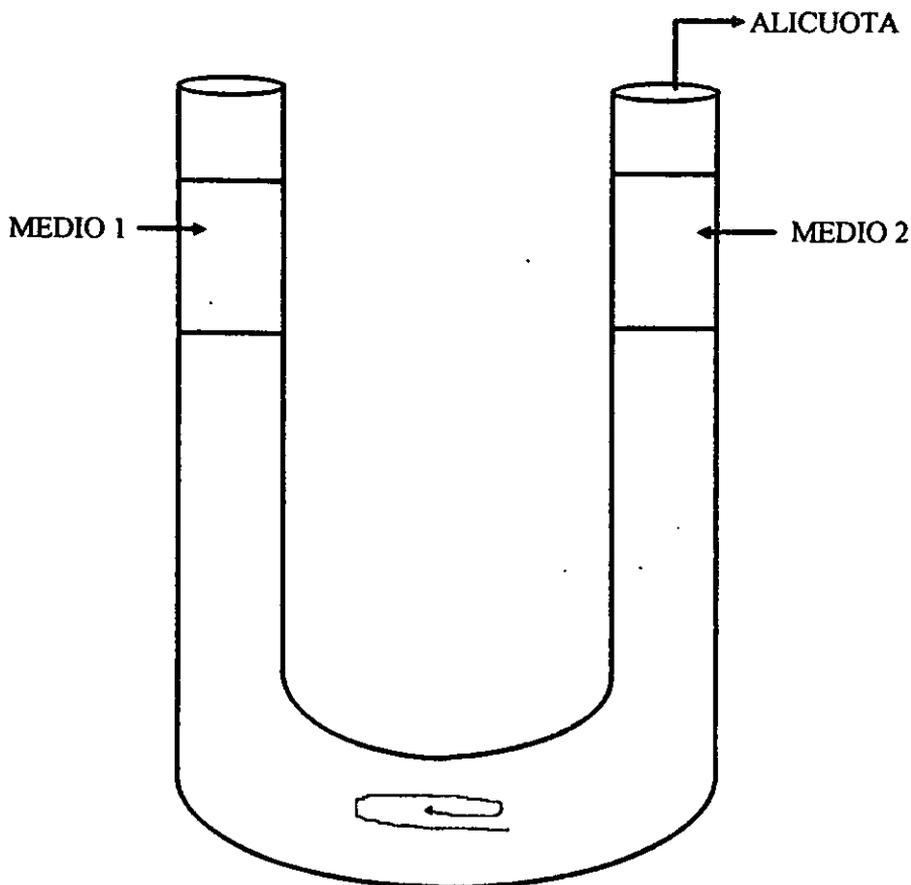
Separación por medio de solventes orgánicos (cloroformo-butanol):

Luego de establecer buenas condiciones para el transporte de calcio en mitocondrias aisladas, se procedió a realizar un esquema de purificación para aislar a las proteínas que intervienen en el transporte del catión. El primer paso fue obtener un extracto liposoluble por medio de solventes orgánicos, capaz de acarrear Ca^{2+} a través de una fase hidrofóbica. El principio de la extracción de proteínas con solventes orgánicos es precipitar diferencialmente a la proteína por cambios en la solvatación (Murray, 1990). Al respecto, existen diversos reportes sobre la extracción de proteínas acarreadoras de calcio en mitocondrias con éste método (Jeng, y col. 1978, Mironova, y col. 1982, Sokolove and Brenza, 1983). El extracto liposoluble se obtuvo a partir de mezclar PSM resuspendida en detergente con solventes orgánicos (cloroformo-butanol). La cantidad de proteína que se disolvió en la fase orgánica por medio de dicha técnica fue de aproximadamente 4 % .

La evaluación de la transferencia de Ca^{2+} por el extracto se determinó por medio del acarreo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a través de un sistema agua-fase orgánica-agua dentro de un tubo en "U" (Fig. 10). Los resultados muestran que después de 25 hrs de incubación, el extracto (240 μg proteína) transportó 4.25 nmol de Ca^{2+} a través de la fase orgánica (Fig. 11). Dicho transporte disminuyó a 2.01 nmol de Ca^{2+} en presencia de 40 μM de R.R. lo que significó una inhibición del 52.7 % . Una vez que la muestra fue hervida se perdió toda actividad (Fig. 11).

Debido a que tanto el colato de sodio, como los fosfolípidos (FLP) se extraen junto con las proteínas por los solventes, fue necesario hacer controles de acarreo de Ca^{2+} separadamente por ambos contaminantes.

La concentración de colato de sodio que se empleó para solubilizar a las PSM fue de 3.3 mg detergente/mg proteína. Si se hace la suposición de que todo el detergente se transfiere a la fase orgánica, la concentración del detergente sería de 1.6 mg/ml



Medio 1.- $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 20.0 μmol
 HEPES 10.0 mM
 pH 7.2

Medio 2.- EGTA 10.0 mM
 HEPES 10.0 mM
 pH 7.2

Fig. 10.- Modelo de tubo en "U" que se utilizó en la transferencia de Ca^{2+} a través de una fase orgánica. En un extremo del tubo se añadió $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (act. esp. 1 400 cpm/nmol) en 4 ml de medio 1. Las PSM previamente disueltas en detergente se solubilizaron en 12 ml de fase orgánica (cloroformo 60 %- n-butanol 40 %). Las alícuotas (50 μl) se obtuvieron a partir de la fase acuosa conteniendo EGTA (medio 2).

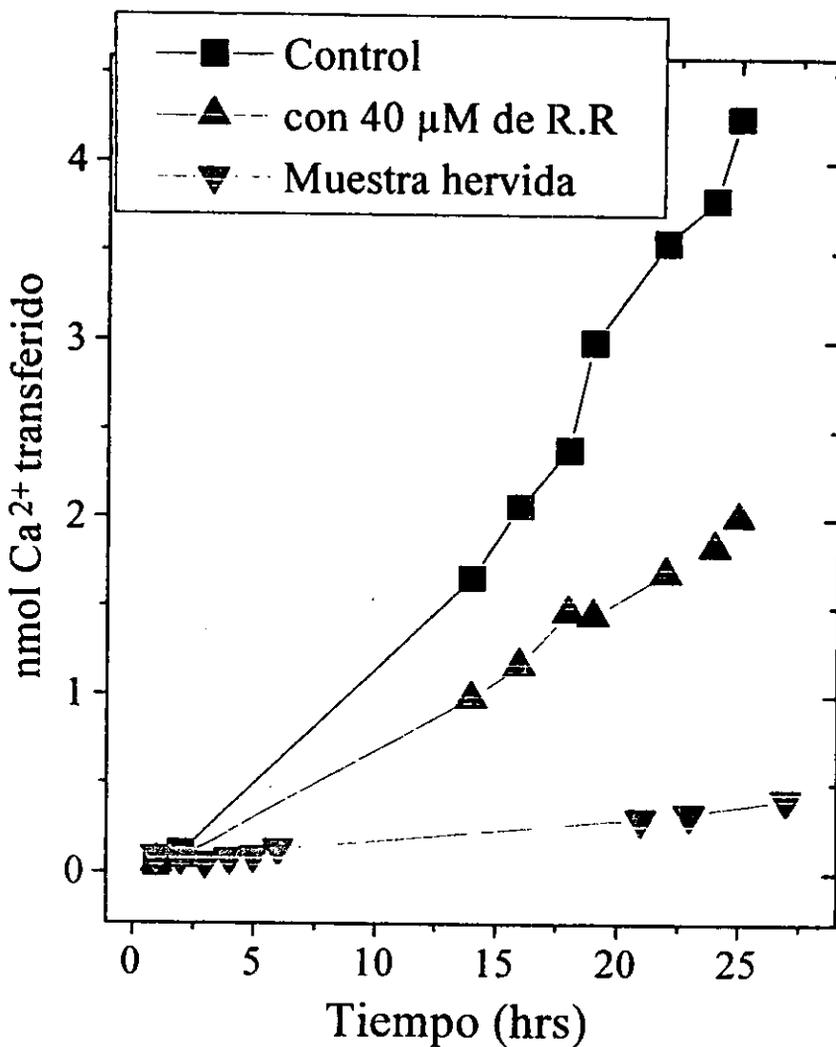


Fig. 11.- Transferencia de Ca^{2+} a través de una fase orgánica. PSM (6 mg) previamente disueltas en detergente se solubilizaron en la fase orgánica. La proteína mitocondrial que se disolvió en el solvente orgánico (240 μg) se aplicó al tubo en "U". Cuando se indica, se añadió 40 μM de R.R. desde el inicio a la proteína disuelta en la fase orgánica.

solvente. Al determinar la transferencia de Ca^{2+} a través de la fase orgánica por dicha concentración de detergente se encontró que por sí solo no transfiere al catión. La concentración de fosfolípido (FLP) que copurificó con las proteínas por cloroformo-butanol fue de 0.316 mg FLP/mg proteína (0.158 mg/ml solvente). Cuando se ensayó esta misma concentración de asolectina en el sistema de tubo en "U" no se encontró una transferencia de Ca^{2+} significativa a través de los solventes. Sin embargo, es importante advertir que incrementándose la concentración de asolectina en el ensayo hasta 0.83 mg/ml solvente, el acarreo del catión por los fosfolípidos es semejante al que se obtiene con el extracto de proteínas.

Las proteínas extraídas por la fase orgánica se recuperaron después de evaporar el cloroformo-butanol con N_2 . La evaluación del número de polipéptidos y de sus pesos moleculares (PM) se determinó por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 12.5 %. El patrón de bandas de la fracción que se obtuvo mediante la extracción con solventes orgánicos (FO) mostró cinco péptidos con los siguientes PM: 78 000 Daltones; 47 000 Daltones; 44 000 Daltones; 32 000 Daltones y 15 000 Daltones (Fig. 12.A).

La FO se incorporó a un sistema de liposomas con formación de gradiente de H^+ . La figura 12.B muestra un experimento representativo donde el transporte máximo de calcio (24.04 nmol Ca^{2+} /mg) se obtuvo a los cinco minutos. Después de 15 min de incubación la actividad disminuyó hasta cero. Cabe destacar que tal transporte fue sensible a la presencia de 40 μM de R.R.

La actividad específica del transporte de Ca^{2+} por el extracto de proteínas que se obtuvo por solventes orgánicos fue poco reproducible. Por lo que se procedió a utilizar un método de aislamiento que permitiera mayor reproducibilidad.

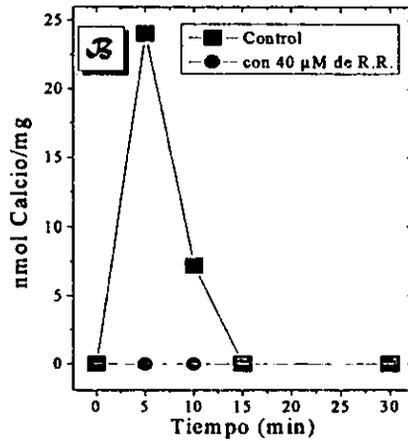
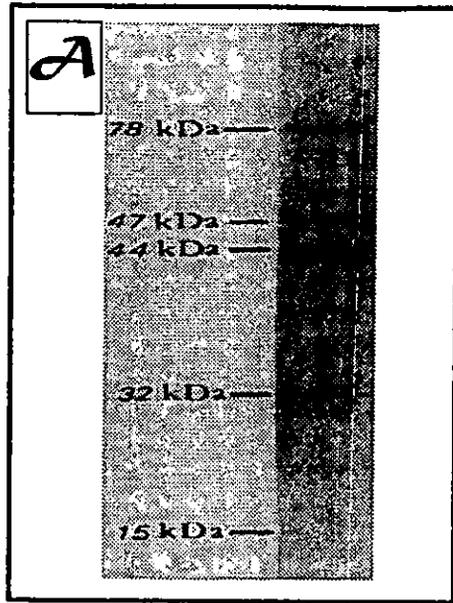


Fig. 12.- Perfil electroforético en geles de poliacrilamida-SDS de los PM de proteínas que se obtuvieron de la fase orgánica (panel **A**). El panel **B** muestra la captación de Ca²⁺ en un curso temporal de dichas proteínas incorporadas a proteoliposomas. Las condiciones del experimento se describen en el apartado de material y métodos.

Aislamiento por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e inmunofinidad:

La estrategia a seguir fue emplear un método inmunoquímico con anticuerpos policlonales. Tales anticuerpos fueron producidos al inocular ratones con un extracto enriquecido del acarreador de calcio de mitocondrias de riñón de rata ($\text{IgG}_{\text{riñón}}$) (Zazueta y col. 1994). Para determinar si tales anticuerpos reconocían a las proteínas responsables de transportar Ca^{2+} , se ensayo la captación del catión en mitoplastos preincubados. Los resultados mostraron que después de 30 min de preincubación con $\text{IgG}_{\text{riñón}}$ la captación de Ca^{2+} fue de 8.4 nmol/mg/11 min, en tanto que el grupo con $\text{IgG}_{\text{control}}$ retuvo 28 nmol/mg/11 min (Fig. 13). Esto significa que los $\text{IgG}_{\text{riñón}}$ reconocieron al acarreador de Ca^{2+} mitocondrial, e inhibieron su actividad en un 70 %. Cabe destacar que en presencia de $\text{IgG}_{\text{riñón}}$ el control respiratorio en mitoplastos no disminuyó.

Por lo anterior, se procedió a emplear una columna de inmunofinidad con $\text{IgG}_{\text{riñón}}$ unidas a un soporte de agarosa. El protocolo de purificación consistió primero en disolver las PSM en un detergente aniónico (Colato de sodio 1.0 %) con un cociente detergente/proteína (p/p) de cinco. Este criterio de solubilización asume que a dicho cociente se encuentran formados en el medio complejos detergente-lipido-proteína, junto con complejos detergente-lipido (Murray, 1990). Lo anterior permite solubilizar a las proteínas membranales con sus fosfolípidos que las rodean, manteniéndolas activas. Una vez que las proteínas de PSM se disolvieron en el detergente, se agrega $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en dos pasos como se describe en Material y Métodos (Fig. 3). El primer paso precipitó la mayor parte de las proteínas mitocondriales a la cual se denominó fracción F50. El segundo paso precipitó al resto de la proteína disuelta en el medio y se le denominó fracción F90. Una vez que a la fracción F90 se le retiró el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se concentró y disolvió en un detergente zwitteriónico mas suave (CHAPS 0.1 %). La F90 disuelta en CHAPS se aplicó posteriormente a la columna de inmunofinidad. El perfil de elución que se obtuvo de la columna mostró un pico de proteína retenida por los $\text{IgG}_{\text{riñón}}$ (Fig. 14).

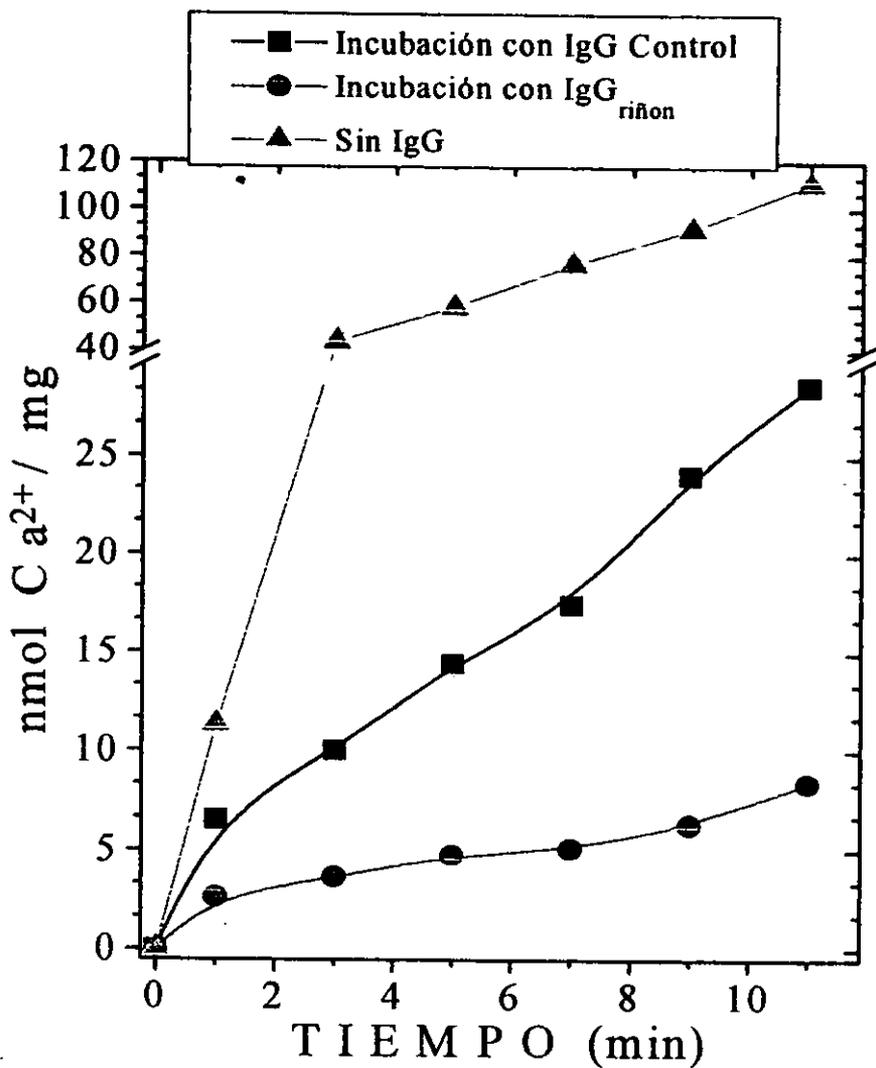


Fig. 13.- Transporte de Ca^{2+} en mitoplastos de plántula de frijol. Dos mg de mitoplastos se preincubaron durante 30 min con IgG_{riñon} o con IgG control a 4°C. El medio de captación se compuso de 0.3 M de manitol, 10 mM de succinato; 10 mM de Pi; 5 μg de rotenona; 10 mM de HEPES pH 7.2. El medio se oxigenó y agitó constantemente, T = 25°C. La actividad del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fue de 1000 cpm/nmol. El volumen final fue de 3 ml.

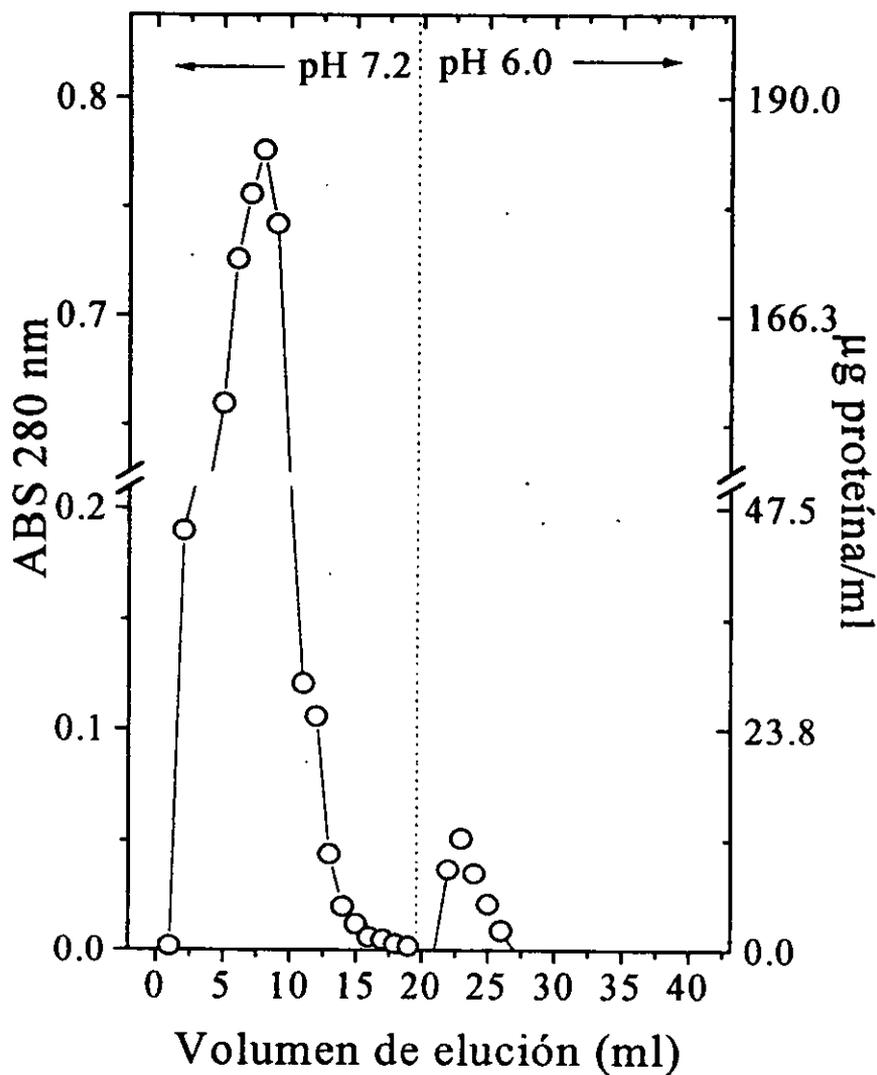


Fig. 14.- Perfil de elución de la columna de inmunoafinidad. Aproximadamente 0.70 mg de F90 se disolvieron en 1 ml de 0.1 % de CHAPS y 10 mM de Trizma base pH 7.2. La mezcla se aplicó a una columna de 2 ml. El lavado y la elución de la proteína retenida en la columna se especifica en material y métodos.

El porcentaje de proteína retenida en la columna fue de aproximadamente 6 % y se denominó fracción retenida (FR). Después de separar la FR de la columna, se determinó su número y tamaño de polipéptidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12 %. El resultado fue la obtención de cinco polipéptidos cuyos PM fueron de 200 kDa, 120 kDa, 75 kDa 61 kDa y 35 kDa (Fig. 15). La FR se incorporó a un sistema de liposomas que bombean protones. Se añadieron 36 µg de la FR a 1 ml de liposomas y se considero que la incorporación de los péptidos a las membranas fue del 100 %. La actividad específica de captación de Ca^{2+} fue de 150 nmol/mg x 15 min.

El rendimiento que se obtuvo de la FR a partir de 1 g de proteína mitocondrial fue de 44 µg, es decir, la fracción que transportó el catión corresponde al 4.4×10^{-3} % del total de proteína mitocondrial.

Producción de anticuerpos (IgY) dirigidos contra la FR.

El siguiente paso fue aumentar la purificación del acarreador de Ca^{2+} por medio de la producción de anticuerpos contra la fracción retenida que presentó actividad. La estrategia pretendía incrementar el reconocimiento inmunológico hacia alguno de los cinco polipéptidos.

La producción de anticuerpos (IgY) se realizó a partir de la yema de huevo de gallinas que se inmunizaron con la FR (Polson y col. 1984; Reyes-Vivas y col. 1996). Sin embargo, la cantidad de adyuvante que se utilizó en el esquema de inoculación descrita en Materiales y Métodos inhibió la ovulación del ave durante 45 días. Lo anterior obligó a recolectar las yemas después de regularizarse el período ovulatorio del ave. La figura 16 (recuadro A) muestra la curva de titulación por el método de ELISA para diferentes fracciones mitocondriales. El resultado muestra la ausencia de reacción sobre la fracción F90. De igual forma, no se encontraron IgY específicos que reaccionaran contra la fracción FR, solo la muestra que contenía las mitocondrias totales manifestó un reconocimiento moderado a bajas diluciones (Fig. 16 recuadro A).

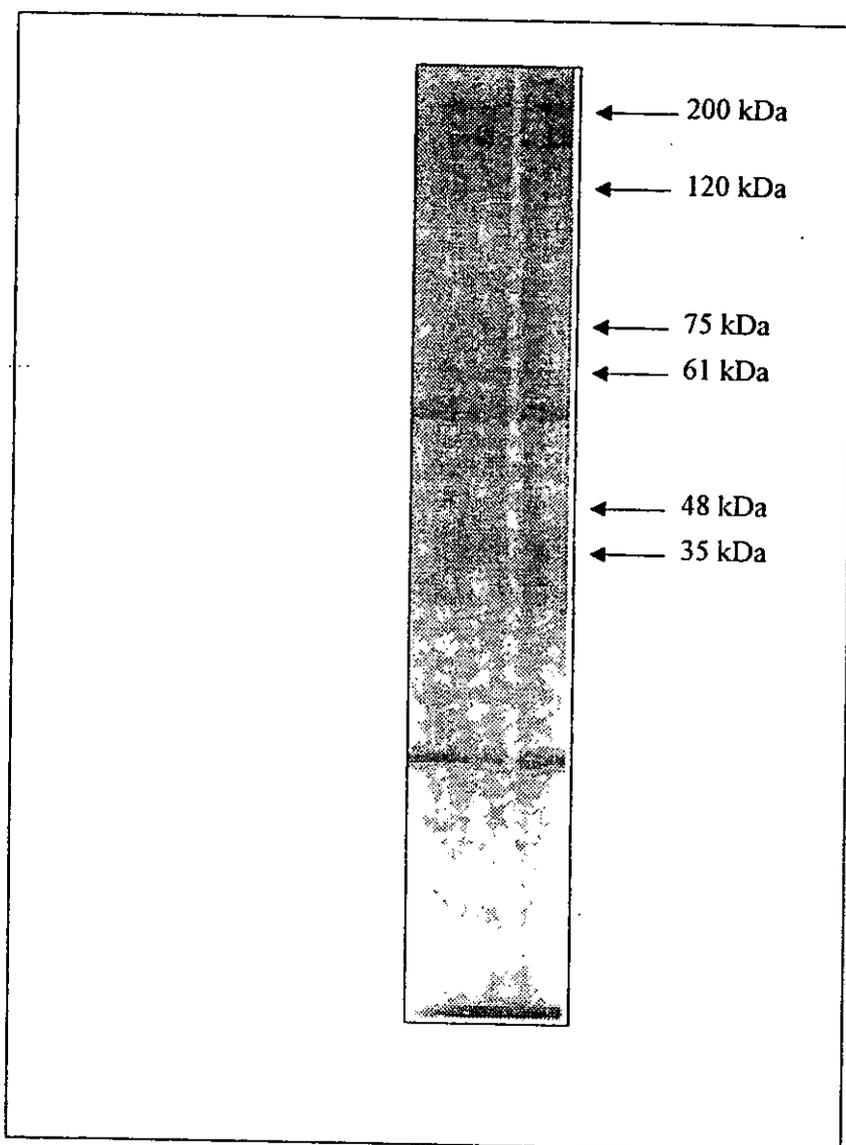


Fig. 15 Perfil electroforético de la fracción que se retuvo por la columna de inmunoafinidad. El gel fue de poliacrilamida-SDS al 12 % y se corrió a 150 Volts. El gel se tiñó con plata y el PM se determinó a partir de la comparación con estándares.

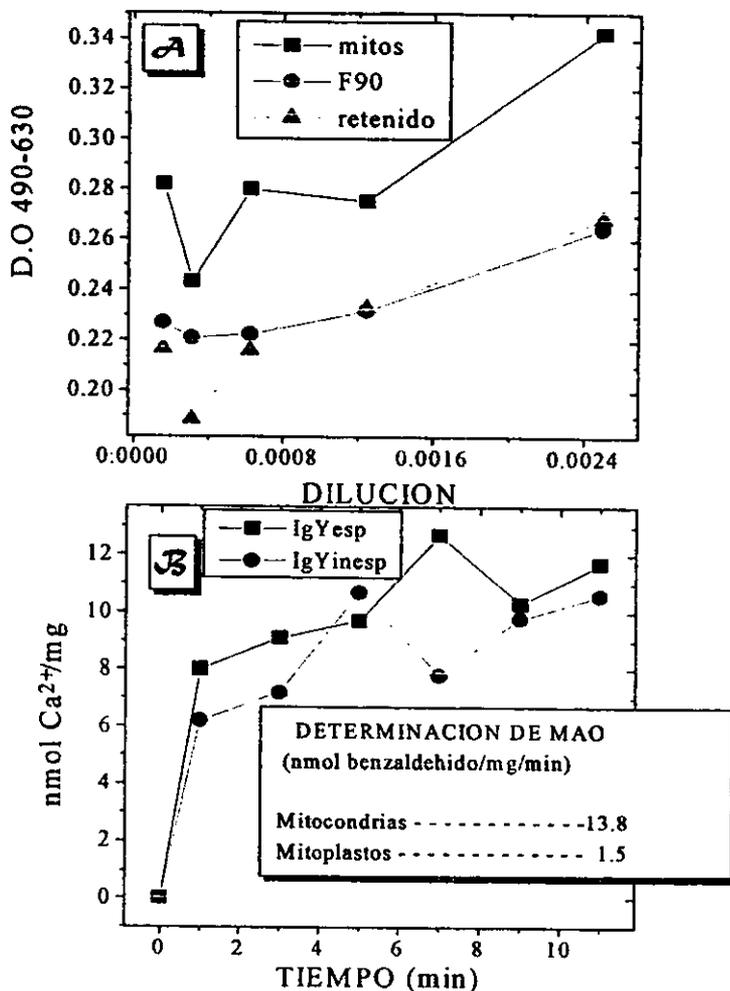


Fig. 16.- El panel "A" muestra la curva de titulación por medio de "ELISA" de IgY obtenidos de un ave que se inoculó con FR. Los anticuerpos se aislaron 45 días después del esquema de inoculación. El panel "B" muestra el transporte de Ca²⁺ en mitoplastos (2 mg) preincubados por 30 min con IgY contra la FR o con IgG control a 4°C. El medio de captación contenía 0.3 M de manitol, 10 mM de succinato; 10 mM de Pi; 5 µg de rotenona; 10 mM de HEPES pH 7.2. El medio se oxigenó y agitó constantemente. T = 25°C. La actividad del ⁴⁵Ca²⁺ fue de 1000 cpm/nmol. El volumen final fue de 3 ml. La determinación de la MAO se llevó a cabo como se describe en material y métodos.

Los resultados que se obtienen de la titulación de los IgY producidos contra la fracción FR se confirmaron al evaluar el transporte de Ca^{2+} en mitoplastos de plántula de frijol preincubados 30 min con tales anticuerpos. Estos datos mostraron que no se obtuvieron IgY que reconocieran al acarreador de Ca^{2+} mitocondrial de *Phaseolus vulgaris* (Fig. 16.B).

Purificación mediante isoelectroenfoque preparativo en fase acuosa de PSM e inmunoadfinidad.

Un problema que se presentó desde el aislamiento de las mitocondrias fue la agregación espontánea de las proteínas. Este problema persistió en las PSM que se solubilizaron en detergentes. Como consecuencia, al fraccionar las PSM con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ el rendimiento de la fracción que transportó Ca^{2+} disminuyó. La agregación no se debió a la unión de lectinas con carbohidratos de glicoproteínas, ya que la unión entre proteínas se mantuvo inalterable en presencia de altas concentraciones de agentes quelantes (0.5 M de EDTA o 0.3 M de EGTA) (Halina and Nathan, 1986). Los polifenoles se descartaron como inductores de la agregación debido a que las mitocondrias se aislaron en presencia de 0.1 % del atrapador de polifenoles, polivinilpirrolidona (PVP) (Murray, 1990). La presencia hasta de 0.6 % de PVP en el medio de homogeneización no disminuyó la agregación. La incubación de las proteínas con un agente reductor como el DTT (100 mM) no revirtió la agregación. Sin embargo, la precipitación de las proteínas se revirtió al incubar a las PSM durante 10 min con 500 mM de KCl y después someterlas a sonicación en presencia de 25 % de glicerol. Sin embargo, al centrifugar las PSM pretratadas y resuspenderlas en 0.3 M de manitol, MOPS 10 mM pH 7.3, nuevamente se agregaron. Por tanto, sólo una fracción de PSM pudo correrse por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Con base a estos últimos resultados fue necesario modificar el protocolo de purificación, teniendo como objetivo aumentar el rendimiento y eliminar la

agregación. La estrategia consistió en solubilizar PSM en un medio conteniendo anfólinas; detergente zwitteriónico, inhibidores de proteasas, y 3 % de glicerol (ver Materiales y Métodos). Inmediatamente después de sonicar a las PSM, se corrieron por isoelectroenfoque preparativo en fase acuosa. Después de 6 hrs, se obtuvieron 20 fracciones cuyos valores de pH formaron un gradiente lineal desde 3 hasta 10. La Fig. 17 muestra el perfil de absorbencia a 280 nm de las fracciones que se obtuvieron por isoelectroenfoque, después de que el pH de cada una se ajustó a 7.0. Los resultados muestran cuatro principales picos de absorción a pH 4.0, pH 5.5, pH 6.5 y pH 7.5. Después de remover las anfólinas de las muestras, se concentraron para almacenarse a -70°C . El perfil de absorbencia y la formación de un gradiente continuo de pH presentó gran reproducibilidad en todas las muestras de PSM que se sometieron a isoelectroenfoque. Las fracciones de varias muestras que se obtuvieron mediante dicha técnica se juntaron conforme migraron a la misma media unidad de pH. Los máximos picos de absorción a 280 nm coincidieron con la mayor concentración de proteína al determinarse por el método de Lowry (1951) (Fig. 18).

Fraccionamiento por inmunofinidad:

El siguiente paso fue seleccionar a las muestras mas ricas en el acarreador de Ca^{2+} . El método consistió en reconocer inmunológicamente al uniportador por medio de los $\text{IgG}_{\text{riñón}}$. Los resultados del ELISA mostraron que los valores mas altos de titulación se encuentran en tres regiones de pH. La primera, en una muestra con un intervalo de pH de 3.5 a 4.0 (A). La segunda en cinco muestras con pH desde 5.0 hasta 7.5 (B); y una tercera región cuyo intervalo de pH fue de 8.5 hasta 10.0 (C) (Fig. 18).

Las muestras de cada región se juntaron, concentraron y se sometieron a diálisis contra PBS + 0.1 % CHAPS + inhibidores de proteasas, pH 7.2. Las tres nuevas muestras (A, B, y C) se solubilizaron en 1 ml para permitir su aplicación en la columna de inmunofinidad.

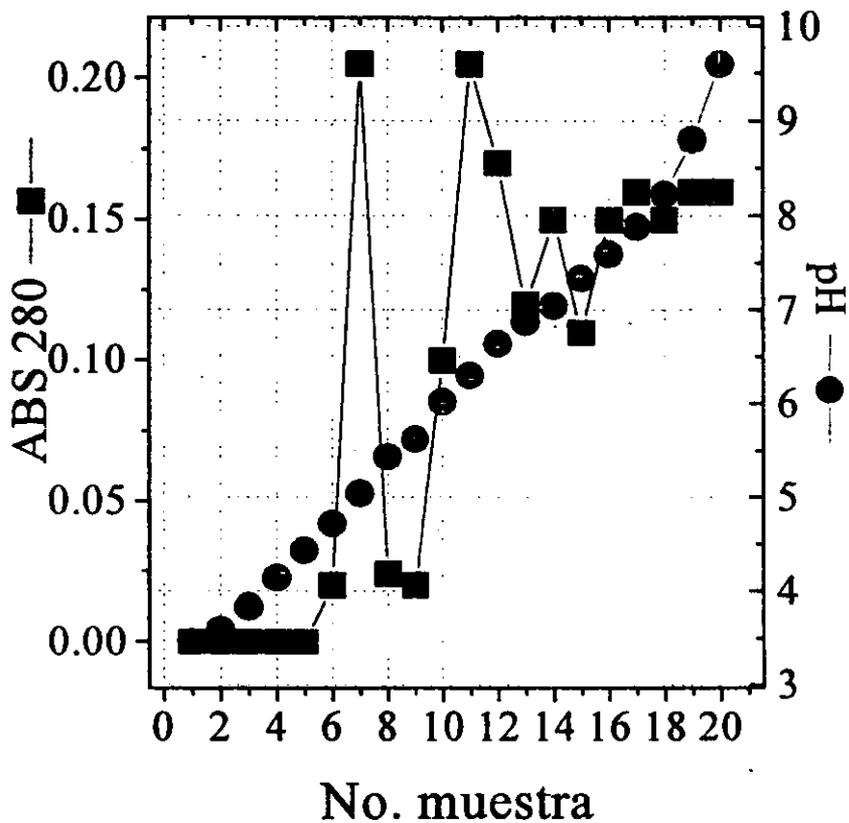


Fig. 17.- Perfil de absorbancia a 280 nm y de pH del isoelectroenfoque preparativo en fase acuosa de PSM (\cong 13 mg) de plántula de frijol. Luego de 6 hrs de corrida las condiciones finales fueron 12 Watts cte; 852 Voltios; 14 mAmps.

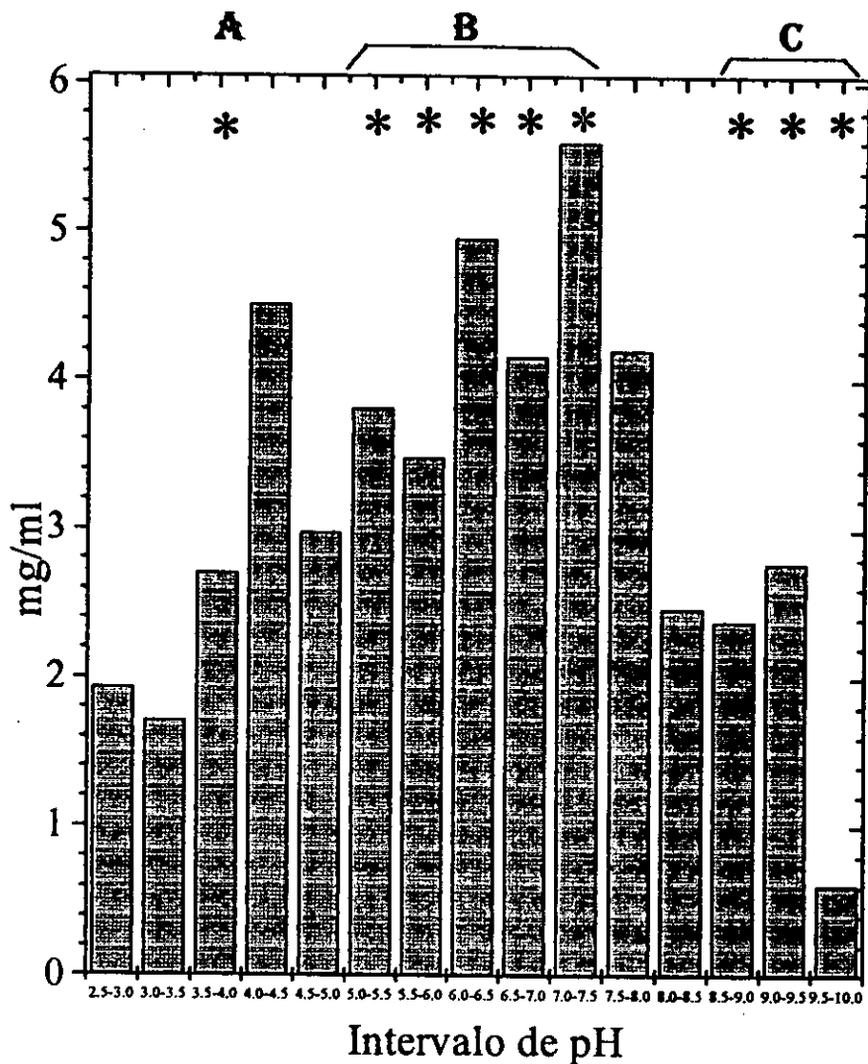


Fig. 18.- Determinación de la concentración de proteína para cada intervalo de pH que se obtiene de la separación por isoelectroenfoque preparativo. La proteína fue medida por el método de Lowry y cols. (1951) empleando albúmina de bovino como estándar. Los asteriscos colocados en la parte superior de algunas barras muestran los intervalos donde se presentó mayor título antigénico por los IgG_{ribon}.

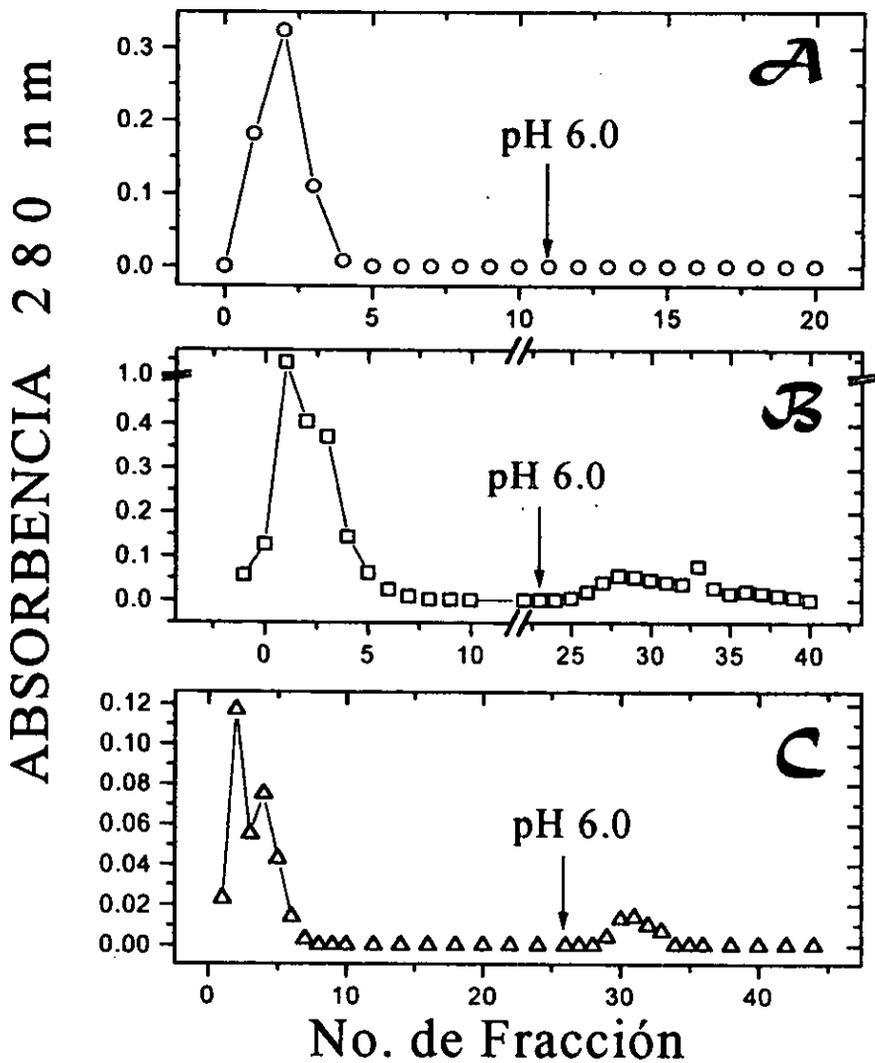


Fig. 19.- Perfiles de elución de las muestras A, B, C, que se sometieron a una columna de inmunoafinidad IgG_{riton} . Las muestras se obtuvieron del isoelectroenfoque preparativo de PSM solubilizadas en detergente. Las condiciones experimentales fueron semejantes a las descritas en la fig. 14 e iguales a las que se especifican en Material y Métodos.

El procedimiento para eluir cada muestra y obtener una fracción retenida fue similar a la elución de la F90. El perfil de elución de las fracciones A, B, y C se muestra en la Fig. 19. Los porcentajes de retención para las muestras A, B, y C fueron 0 %, 6.56 % y 11.0 % respectivamente. Las fracciones retenidas de B y C (FB y FC respectivamente) se concentraron y sometieron a diálisis contra CHAPS 0.1 % + inhibidores de proteasas + 50 mM de Pi pH 7.2. La electroforesis de FB y FC se muestran en la Fig. 20. El patrón de bandas para la FB mostró seis principales péptidos, sus PM fueron de 109 kDa; 67 kDa; 48 kDa; 30.2 kDa; 25.1 kDa; y 18.0 kDa. La electroforesis de la FC se contaminó desafortunadamente con otras proteínas presentes en la mezcla desnaturizante, haciendo imposible el correr otra muestra por carecer de más FC. Sin embargo, tales contaminantes pudieron descartarse a partir de un carril libre en el cual sólo se corrió la mezcla. En dichas condiciones la FC presentó sólo una banda principal cuyo PM fue de 25.1 kDa.

Al determinarse la cantidad de proteína en los geles por densitometría óptica, se encontró el enriquecimiento de diferentes bandas entre ambas fracciones. De manera interesante, las fracciones que se obtuvieron de cada protocolo de aislamiento (Fase orgánica, precipitación e isoelectroenfoque) coincidieron en dos regiones de similar PM. La primera región fue aquella cuya migración permite relacionar un PM promedio de 50 kDa (47, 48 y 52 kDa para la FO , FB y FR respectivamente). La segunda región fue en una zona cercana a los 33 kDa (32, 30.2 y 35 kDa para FO, FB y FR respectivamente).

Determinación de la actividad de las fracciones obtenidas por inmunoadfinidad:

Para evaluar la actividad de FB y FC, las fracciones se incorporaron en proteoliposomas capaces de formar un gradiente de H^+ . En este caso, una cantidad conocida de la FB se reconstituyó a liposomas sin Cyt aa₃ para determinar la concentración real de proteína que se incorporó al liposoma. El método consistió en separar la proteína que no se incorporó mediante una columna de exclusión molecular

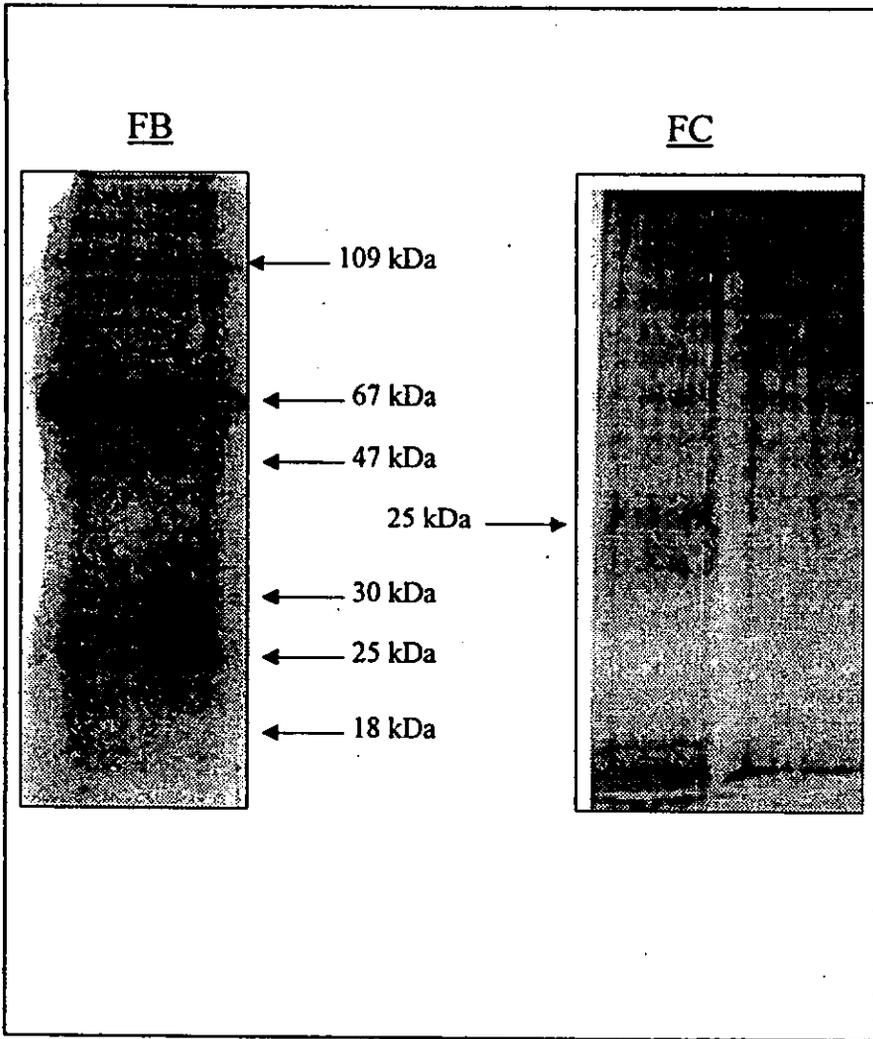


Fig. 20.- Perfiles de las fracciones FB y FC que se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10 %. La determinación del peso molecular fue en base a la comparación de estándares de PM que se sometieron a electroforesis paralelamente con las muestras. La tinción se realizó con plata.

(sephadex G-50 a 80) (Garret and Penefsky, 1975). Los datos mostraron que del total de proteína que se añadió a los liposomas sólo un 48 % se logró reconstituir en las membranas. La cinéticas de transporte de Ca^{2+} de FB y FC que se incorporaron se muestran en la Fig. 21. La cinética de la fracción B mostró un retardo inicial para captar calcio. Sin embargo, después de 15 min la captación del catión comenzó a incrementarse obteniéndose una actividad de 279.3 nmol Ca^{2+} /mg a los 45 min. Es importante advertir que estos valores se obtuvieron después de restar un control que se evaluó paralelamente con cada ensayo. Este control no contenía sustrato oxidable, por lo que no formaba un gradiente electroquímico. El ensayo del transporte de calcio en presencia del R.R no logró llevarse a cabo. La adición de 10 o 40 μM del inhibidor en la reacción no permitió separar el $^{45}\text{Ca}^{2+}$ unido inespecíficamente fuera de la matriz, a pesar de lavar con 5 ml de Ca^{2+} 10 mM a los proteoliposomas retenidos en el filtro. Esto aumentó los valores de cuentas por minuto drásticamente y sin relación con los datos de inhibición que previamente se establecieron en mitocondrias completas (Fig. 9). La adición de una menor concentración de R.R. sólo inhibiría una fracción del transporte, como se observó para el caso de mitocondrias completas (Fig. 9). Mediante las mismas condiciones experimentales, la fracción C que se reconstituyó fue incapaz de transportar $^{45}\text{Ca}^{2+}$ hacia el interior de los proteoliposomas. Para corroborar que el transporte de Ca^{2+} a través del acarreador coincidió con la presencia de un gradiente electroquímico en el sistema reconstituido, se determinó la formación del $\Delta\Psi$ en proteoliposomas con y sin la FB incorporada. Para realizar estos ensayos se incorporó la FB a una concentración de 350 $\mu\text{g/ml}$ proteoliposomas, considerándose que sólo el 48 % de la FB que se añade logra reconstituirse. La medición fue por medio de la evaluación del apagamiento de la cianina fluorescente DiSC₃ (Hinkle, 1976; Ramírez y col. 1987) que corresponde a la formación de $\Delta\Psi$. Los resultados demostraron que la formación del $\Delta\Psi$ es inmediata, depende tanto de sustrato oxidable como de oxígeno, y fue sensible al desacoplante CCCP y al detergente tritón X-100 (Fig. 22-A). Sin embargo, de manera similar a lo que ocurre en mitocondrias completas, el transporte de Ca^{2+} a través de la FB reconstituida en los

proteoliposomas, no afectó el $\Delta\Psi$ a pesar de presentar en el medio altas concentraciones del catión (Fig. 22-B).

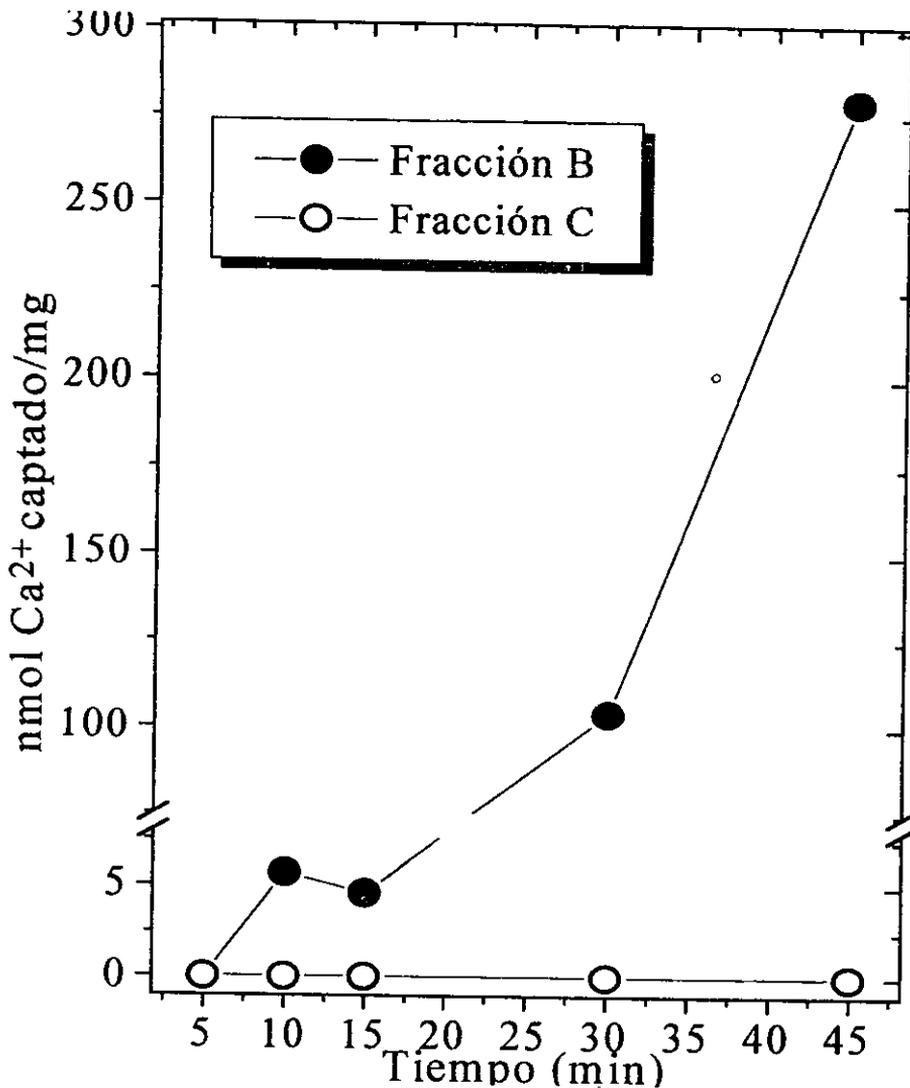


Fig. 21.- Transporte de Ca^{2+} de la FB y la FC que se incorporó en proteoliposomas que forman un gradiente de H^+ . Los valores de la gráfica se restaron de un control con las mismas condiciones experimentales pero sin sustrato oxidable. La determinación de la captación de calcio por filtración así como las condiciones experimentales se encuentran descritas en el apartado de Material y Métodos.

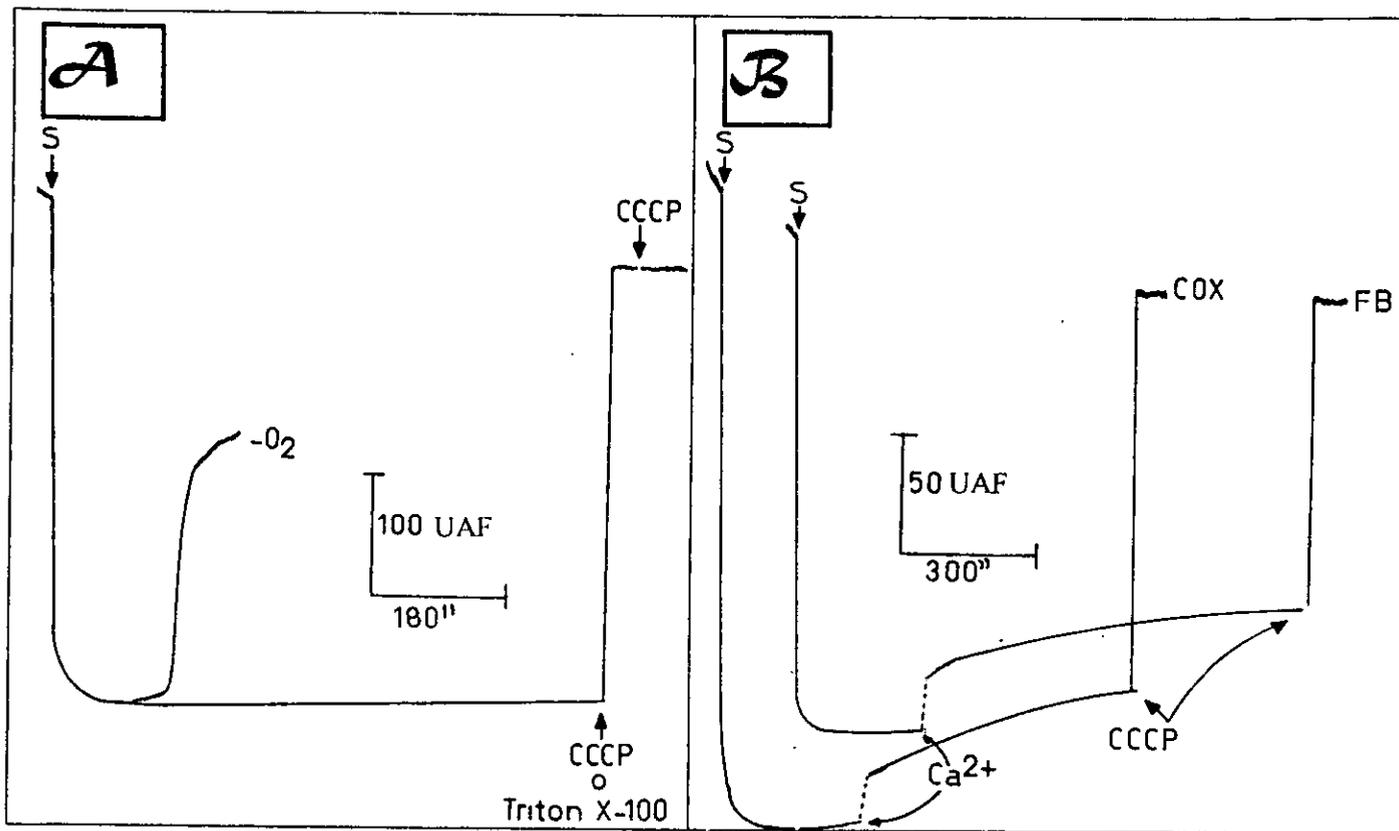


Fig. 22.- Determinación del $\Delta\Psi$ por fluorometría en proteoliposomas que forman un gradiente de H^+ (negativo en el interior) y además presentan la FB reconstituida. La concentración de FB que se incorporó fue de $7 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ liposomas. Cuando se señala, $20 \mu\text{l}$ de liposomas se añadieron a un medio formado de TEA-Pi 50 mM, $0.5 \mu\text{M}$ DiSC₃, 7.5 mM de ascorbato, 0.75 mM de TMPD, y 2.5 mM de citocromo c soluble equino. COX = proteoliposomas sin la incorporación de FB; FB = proteoliposomas con la incorporación de FB. En el panel A muestra la sensibilidad del $\Delta\Psi$ por CCCP o Triton X-100. El panel B muestra la adición de diferentes concentraciones del catión en distintos tiempos. El medio se mantuvo en agitación y oxigenación constante; T = 30°C. La longitud de onda de excitación y emisión fue de 540-590 respectivamente. UAF = Unidades Arbitrarias de Florescencia.

DISCUSION.

Transporte de Ca²⁺:

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el transporte de Ca²⁺ en mitocondrias de plántula de frijol es electroforético y tiene características semejantes a las mitocondrias de vegetales y algunos microorganismos descritas anteriormente (Ferguson y col. 1985; Uribe y col. 1994). Entre ellas se encuentra la dependencia de Pi como anion permeante para transportar calcio, sin poder sustituirse por algún otro anión como el nitrato o acetato (Fig. 6). No existe aún una explicación concluyente respecto a la dependencia del transporte del catión por fosfato. Por ejemplo, Silva y col. evaluaron la dependencia del fosfato en el transporte de calcio de mitocondrias de maíz (1992). Ellos observaron que la velocidad de captación de Ca²⁺ y de Pi eran paralelas y con un cociente Ca²⁺/Pi de 1.5; ambos transportes eran además inhibidos de igual forma por 10 µM de mersalyl. Con lo anterior se propuso un simportador de Ca²⁺/Pi sensible a mersalyl semejante al que se postuló años antes por otros grupos (Moyle y Mitchell. 1977; Day y col. 1978). Sin embargo, no es posible descartar que el fosfato se transporte independientemente del Ca²⁺ por medio del acarreador Pi/H⁺ (Rossi y Lehninger. 1964; LaNoue y Schoolwerth. 1979). Se sabe que el Pi al entrar a la matriz no sólo transforma el ΔpH en ΔΨ, el Pi también puede formar un complejo insoluble con el calcio e incrementar así la captación del catión. Debe recordarse además que en ausencia de algún ion permeante la única manera que tiene la mitocondria para compensar la entrada de dos cargas positivas del Ca²⁺ es mediante el bombeo de protones fuera de la matriz. La capacidad amortiguante de la matriz es de aproximadamente 10 a 20 nmol H⁺/unidad de pH x mg proteína (Mitchell y Moyle, 1969; Nicholls, 1987). En estas condiciones, Åkerman y Nicholls (1983; 1987) demostraron que la captación de 10 a 20 nmol Ca²⁺/mg proteína en

ausencia de algún ion permeante incrementaría el pH de la matriz dos unidades, lo que disminuye el $\Delta\Psi$ de 165 ± 15 mV a sólo 120 mV. Por lo que la ausencia de aniones en el medio limita la captación de una mayor cantidad de Ca^{2+} . Debido a lo anterior, una explicación alternativa a la dependencia de Pi es considerar la baja velocidad de difusión del acético y el nítrico a través de la membrana interna. Es posible que la velocidad de difusión de tales aniones en mitocondrias de sistemas vegetales sea significativamente más lenta que en los sistemas de mamíferos. Por tanto, para tiempos cortos la capacidad para neutralizar las dos cargas del Ca^{2+} sería muy baja. Esta última posibilidad tendría que explorarse. Nuestros resultados en oximetría muestran que en presencia de 5 mM de Mg^{2+} , un inhibidor competitivo del uniportador (Martins y col. 1986), se promueve la síntesis de ATP a partir de ADP, Pi y substratos exógenos (Fig. 4).

La presencia de 0.6 mM de ADP no mejoró significativamente el transporte de Ca^{2+} en la variedad de *Phaseolus vulgaris* que se estudió (Fig. 6). Este hecho cuyo menos se repite en un organismo evolutivamente lejano como lo es *Euglena gracilis* (Uribe y col. 1994).

El transporte de Ca^{2+} es electroforético y es más lento que el bombeo de H^+ por la cadena respiratoria. Esta conclusión se basa en tres principales observaciones. 1) La ausencia de estimulación de la respiración por adición de Ca^{2+} (Fig. 4), contrario a lo que se observó en otros sistemas vegetales (Chen y Lehninger, 1973; Martins y col. 1986). 2) A pesar de obtenerse un $\Delta\Psi$ de magnitud semejante al de mitocondrias de otras células vegetales (Akerman y Moore, 1983; Morselli y Pereira-Da-Silva, 1992) la adición de Ca^{2+} no indujo una depolarización transitoria en las mitocondrias de plántula de frijol (Fig. 5) en contraste con otros sistemas (Lotscher y col. 1980; Chávez y col. 1991; Uribe y col. 1994). 3) El valor de la $V_{\text{max}} \text{mg}^{-1}$ de captación de Ca^{2+} (38.37 ± 3.16 nmol/mg x min) (Fig. 6) es cuarenta veces inferior a lo que se reportó para el caso de mitocondrias de corazón de perro (1,750 nmol/mg x min.

McMillin-Wood y col. 1980), y tres veces menor al que se reporto para mitocondrias de maíz (140 nmol/mg x min. Martins y col. 1986).

La cinética del transporte de *Phaseolus vulgaris* es de tipo sigmoideo (Fig. 7), en razón de que los valores de coeficiente de Hill son cercanos a dos (1.75 ± 0.38). El valor de desviación estar para ~~li~~ puede explicarse en base al error experimental que se presentó en la técnica (Fig. 7 y 8) Este tipo de cinética se encontró también en el maíz (*Zea mays*), donde se encontró un coeficiente de Hill para el transporte de Ca^{2+} de 2.2 (Martins y cols, 1986). El hecho de encontrar una cinética similar en una planta como lo es *Zea mays*, apoya los resultados que se obtuvieron en nuestro laboratorio

El transporte de calcio en mitocondrias de frijol es sensible a R.R (aprox. 92 % de inhibición). La concentración de R.R (30 μM) que se requirió para inhibir el transporte está en la magnitud que anteriormente se reportó en las mitocondriales de otros vegetales (Dieter et al 1980; Chen y Lehninger, 1973). Este resultado sugiere que el acarreador de calcio en las mitocondrias de *Phaseolus* es una glicoproteína, como se ha propuesto desde hace veinte años para las mitocondrias de mamíferos (Rossi, y col. 1973). La distinta sensibilidad entre los uniportadores de sistemas mitocondriales, vegetal y mamífero, por el R.R. puede explicarse en dos formas que no requieren ser mutuamente excluyentes:

- a) La presencia de sitios diferentes al uniportador que unen fuertemente al R.R. Tales sitios requieren de ocuparse primero, secuestrándose así una considerable cantidad del inhibidor. Al respecto, Luft (1971) demostró la existencia de una amplia gama de compuestos orgánicos con afinidad para el R.R. Entre ellos se encuentran fosfolípidos tales como la cardiolipina, y la fosfatidilcolina (Scarpa y Azzone, 1969).
- b) La existencia de diferencias estructurales entre los acarreadores de Ca^{2+} de *Phaseolus* y de mamífero que provocaran cambios en la sensibilidad al R.R. En este sentido, las diferencias en algunos residuos aminoáciles podrían inducir que el sitio

de unión del polication en el uniportador de *Phaseolus* se encuentre menos expuesto que en el de mamíferos. Existe por lo menos un ejemplo bien descrito donde se observó esta conducta de sensibilidad a inhibidores para la misma enzima de diferentes especies. Las enzimas trifosfato isomerasa de los parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* tienen el 70 % de sus residuos idénticos. Sin embargo, la diferencia en sensibilidad por algunos inhibidores no competitivos es de aproximadamente tres ordenes de magnitud (Ostoa-Saloma, y col. 1997., Maldonado, y col. 1997).

AISLAMIENTO DEL ACARREADOR DE Ca^{2+} :

Extracción con solventes orgánicos:

El protocolo de purificación por medio de solventes orgánicos en PSM de frijol muestra que es posible extraer un ionóforo liposoluble para calcio sensible a temperatura, y parcialmente sensible a R.R. (Fig. 11). La actividad del ionóforo de *Phaseolus* (0.708 nmol Ca^{2+} /mg x h) es notablemente menor al que se reportó para el ionóforo de mitocondrias de corazón de res (64.8 nmol Ca^{2+} /mg x h) (Blondin, 1974). Sin embargo, las diferencias en el esquema de purificación descrito por Blondin, tal como la preincubación de las mitocondrias con Tripsina y organomercuriales pueden significar el aislamiento de un ionóforo con características químicas notablemente distintas a las de *Phaseolus*. Además, la ausencia de experimentos en presencia de R.R. no permite evaluar la sensibilidad de tal ionóforo al polication. Por otra parte, las características del ionóforo de *Phaseolus* son similares a las de mitocondrias de corazón de carnero que se denominó como "calciforina" (Jeng y Shamoo, 1980; Sokolove y Brenza, 1983). En estos reportes la calciforina presentaba una considerable actividad (11-62 nmol Ca^{2+} /mg x h) y se inhibió completamente por R.R. Las distintas actividades podrían deberse en parte a las diferencias entre las

técnicas de transporte que se utilizaron, por ejemplo, el pH entre las fases acuosas aceptoras y donadoras. Para el caso de *Phaseolus*, el pH que se empleó en ambas fases del tubo en "U" fue de 7.2. En contraste, los estudios en calciforina se realizaron con distintas unidades de pH entre las fases donadora (pH = 8.4) y aceptora (pH = 6.0). En estas condiciones se reportaron los valores máximos y se advierte la falta de transporte en ausencia de tal gradiente (Jeng y col. 1978). El transporte de Ca^{2+} que llevó a cabo una concentración de fosfolípidos similar a la que copurificó con el ionóforo de *Phaseolus* (0.316 mg FLP/mg proteína) demostró no contribuir significativamente al acarreo del catión. No obstante, debe advertirse que este control no es completamente estricto debido a que la asolectina tiene en menor proporción algunos FLP presentes en mitocondrias. Tal es el caso de la cardiolipina (CLP), la cual se encuentra en un 17.2 % del total de fosfolípidos mitocondriales (Fleischer y col. 1967). Se ha demostrado que la CLP a concentraciones por arriba de 400 μM presenta gran capacidad para transportar Ca^{2+} a través de una fase orgánica (cloroformo-metanol) (Tyson y col. 1976). Sin embargo, la presencia de otros fosfolípidos como lecitina y proteínas tales como citocromo c, en la misma mezcla, reducen la efectividad ionofórica de la CLP a tan sólo un 45 %. Más aún, el cálculo de la concentración de este lípido que copurifica con el ionóforo de *Phaseolus*, considerándose la abundancia que reportó Fleischer (1967) y un PM de 1,100, se calculó un valor de 987 nM de CLP contaminante. El valor que se estima en esta forma es muy inferior al que observó el grupo de Tyson (1976) como importante para transportar calcio.

El rápido decaimiento de la actividad del ionóforo de *Phaseolus* cuyo se incorporó en un sistema artificial de membranas puede reflejar la sensibilidad de este acarreador a un ambiente distinto al natural (Fig. 12.B). Cabe destacar que los métodos de extracción con solventes orgánicos tienden a desnaturalizar proteínas. Un punto que suele enfatizarse cuando se extraen proteínas con solventes orgánicos es

trabajar estrictamente a temperatura constante (Murray, 1990). Para aislar al ionóforo mitocondrial de frijol la temperatura se mantuvo constante a 4°C. Sin embargo, en el proceso de evaporación del solvente e incorporación a liposomas fue necesario exponer a la proteína a diferentes temperaturas, lo que pudo afectar la estabilidad del acarreador. Este hecho podría concordar con la hipótesis de que dicho ionóforo es de carácter proteico, y de que *in vivo* es el que se encarga de transportar Ca^{2+} en *Phaseolus*, pudiendo además inhibirse por R.R.

Aislamiento por precipitación e Inmunoespecificidad:

La inhibición del transporte de Ca^{2+} en *Phaseolus* por $IgG_{riñón}$ policlonales (Fig. 13), sin la alteración de otras funciones mitocondriales, puede interpretarse en dos formas: i) La especificidad de los $IgG_{riñón}$ es tan alta que solamente reconocen al acarreador de Ca^{2+} cuyo epítipo se encuentra además en alguna región que afecta su actividad y ii) Los $IgG_{riñón}$ reconocen al acarreador pero también reconocen otras proteínas cuyos epítopos no involucran sitios que afecten sus actividades. La presencia de por lo menos cinco proteínas con PM que van desde 35 kDa hasta los 200 kDa en la fracción retenida por la columna de inmunoespecificidad (Fig. 15), podría apoyar la segunda hipótesis. Debido al rendimiento que se obtiene por medio de la técnica inmunoquímica (44 μg FR/g proteína mitocondrial) solo se determinó la actividad en un valor de tiempo (150 nmol Ca^{2+} /15 min x mg) y no fue posible determinar su sensibilidad a R.R.

La producción de IgY contra la FR (IgY_{FR}) no logró completarse en virtud de que el exceso de adyuvante que se administró al ave (1 ml/inyección) inhibió su ovulación durante 45 días. Esto provocó que la respuesta inmunológica contra la FR decayera. Lo anterior se reflejó tanto en la curva de titulación por el método de ELISA, como en el transporte de Ca^{2+} de mitoplastos (Fig. 16).

Aislamiento por isoelectroenfoque e Inmunofinidad:

La disminución del rendimiento por la agregación de proteínas se resolvió al emplear la técnica de isoelectroenfoque preparativo, en vez de la precipitación con $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ (Fig. 17). Lo anterior se reflejó en tres puntos: 1) las concentraciones homogéneas que se obtuvieron de cada fracción de pH (Fig. 18); 2) la disminución de la agregación en todas las fracciones que se obtuvieron, y 3) el mayor rendimiento de una fracción rica en actividad (FB = 1.164 mg totales). Una de las razones por las cuales se decidió juntar varias fracciones, en vez de trabajar individualmente con ellas, fue el número de veces que se requeriría utilizar una misma columna de inmunofinidad. Estas columnas presentan una vida media de sólo 10 pasos de elución, por lo que fue necesario reducir y optimizar el número de eluciones. Por otra parte, a excepción de la muestra "A", las regiones que se reconocieron mediante la técnica de ELISA coincidieron en retener una fracción dentro de la columna (Fig. 19). Sin embargo, el porcentaje de retención no se relacionó con la actividad presente en las fracciones. Esto nuevamente puede explicarse si se considera que los $\text{IgG}_{\text{riñón}}$ no solamente reconocieron a una sola proteína que transporta calcio; los anticuerpos también fueron capaces de reconocer otras proteínas mitocondriales de *Phaseolus*. Este razonamiento es consistente con el método que se empleó para la formación de los $\text{IgG}_{\text{riñón}}$ (Zazueta y col. 1994) cuyo inóculo fue un extracto mitocondrial rico en actividad de transporte.

La actividad del transporte de calcio solamente se encontró en la fracción B, es decir, aquella que al someterse a isoelectroenfoque migró hacia un intervalo de pH de entre 5.0 a 7.5 (Fig. 23). Esto significa que el punto isoeléctrico del acarreador se encuentra en este intervalo de pH. Tal punto isoeléctrico coincide con el que observó Zazueta para el uniportador de Ca^{2+} en mitocondrias de riñón (comunicación personal). Debido a que sólo se determinó un valor para la FR, no es posible comparar las fracciones FR y FB. Sin embargo, resulta interesante encontrar una

diferencia considerable de la captación en un mismo tiempo. Mientras la FR transportó 150 nmol de Ca^{2+} a los 15 min, la FB comienza a transportar éste catión después de dicho tiempo, captándose posteriormente 279 nmol en 45 min.

La cinética del acarreador que se aisló por el método de isoelectroenfoque e inmunoafinidad presentó un retardo en el transporte de 10 a 15 min (Fig. 24). Esto puede explicarse si se considera la presencia de una competencia por Ca^{2+} entre el fosfato y el acarreador (Fig. 23). El producto de solubilidad (K_{ps}) del fosfato de calcio (CaHPO_4) que se reporta en condiciones de $\text{pH} = 7.1$ y con una temperatura de 38°C es 3.4×10^{-6} (Linke, 1958).

De acuerdo con el principio del producto de solubilidad (Ayres, 1978), si el producto iónico (P.I) de los reactantes es mayor que el K_{ps} del compuesto que se forma por su unión, este compuesto precipitará. El P.I se obtiene de la siguiente forma: $\text{P.I.} = [\text{Ca}^{2+}] \times [\text{HPO}_4^{2-}]$. Sustituyéndose las concentraciones de Ca^{2+} y Pi que se utilizan para los experimentos de las fig. 21 y 22, en la ecuación obtenemos un P.I $= [5 \times 10^{-4}][0.05] = 2.5 \times 10^{-5}$. Este valor es sólo un orden de magnitud mayor que K_{ps} y significa que la solución esta en saturación y se comienza a precipitar. Ello afecta la concentración de Ca^{2+} libre ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$) presente en el medio, de acuerdo con la ecuación: $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}} = K_{ps}/[\text{HPO}_4^{2-}]$ lo cual predice que de 500 μM de calcio que se añadió solo hay libre 68 μM . Lo anterior significa que en los primeros minutos la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ se encuentra por debajo de la $K_{0.5}$ (128 μM) disminuyéndose considerablemente el transporte. Sin embargo, a medida que el calcio se capta en los liposomas, el P.I disminuye a valores semejantes a K_{ps} . Por lo que, de acuerdo con la ley de acción de masas la velocidad de solubilización del fosfato de calcio (v_1) aumentaría. Así, se incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}}$ y por tanto, la velocidad del transporte del catión hacia el interior del liposoma también se acelera (v_2) (Fig. 23).

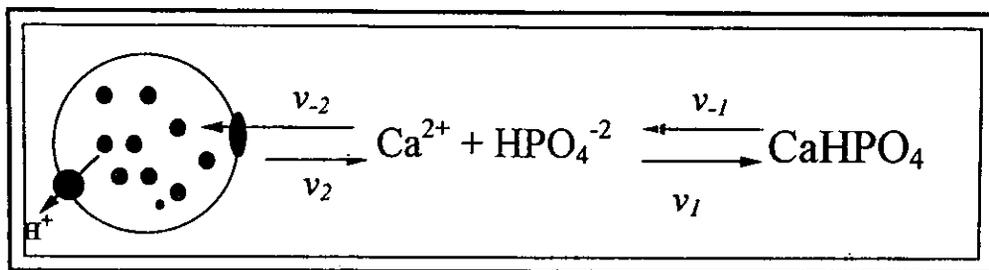


Fig. 23.- Esquema del transporte de Ca^{2+} en proteoliposomas que forman un gradiente de protones.

El efecto de retardo no puede explicarse en términos de velocidad de formación de $\Delta\Psi$ en liposomas, pues la formación de tal potencial es inmediato (Fig. 22).

La adición de Ca^{2+} no disminuyó considerablemente el $\Delta\Psi$, ya que las concentraciones de Pi que se utilizaron (50 mM) permiten amortiguar la diferencia de cargas, aún en la presencia de altas concentraciones del catión. Este resultado puede explicarse también cinéticamente. Al igual que en mitocondrias (Fig. 5), donde se utilizaron bajas concentraciones de Pi (5 mM), el transporte de Ca^{2+} no despolariza a la membrana mitocondrial. Tal evento se explicó al considerarse que el transporte de Ca^{2+} es más lento que el bombeo de H^+ . Este hecho se mostró consistente en el modelo de liposomas y por tanto, es un reflejo de lo que se observa en mitocondria intacta.

La comparación mediante electroforesis de las fracciones que se aislaron por los tres distintos métodos (FO, FR y FB) mostraron dos regiones con proteínas de similar peso molecular (Fig. 12, 15 y 22). La primera región relaciona a proteínas con un PM promedio de 50 kDa, la segunda región relaciona proteínas con PM promedio de 33 kDa. De manera interesante, la densitometría para la proteína de bajo PM se relaciona directamente con la actividad de captación presente. Esto sugiere fuertemente que la proteína responsable en el transporte de Ca^{2+} en las mitocondrias de plántula de frijol

es aproximadamente de 30 kDa. Sin embargo, no se puede descartar completamente la posibilidad de que el PM del acarreador sea de 50 kDa. Por otra parte, la fracción que no presentó actividad (FC) contiene sólo una proteína con un PM de 25.1 kDa sin presentar alguna proteína con un PM de 33 kDa o 50 kDa (Fig. 22). En reportes donde se aislaron acarreadores de Ca^{2+} mitocondriales, la asignación del PM fluctúa en un intervalo entre 30 a 67 kDa (Gómez-Puyou y col. 1972; Sottocasa y col. 1972; Mironova y col. 1982; Zazueta y col. 1994). Existe además un considerable número de reportes de acarreadores catiónicos y aniónicos de mitocondria cuyos PM varían entre 30 y 82 kDa. Ejemplo de ellos son el K^+/H^+ con un PM = 82 kDa (Martin y col. 1984), el de ornitina/ H^+ con PM = 33.5 kDa (LaNoue y Schoolwerh, 1979) y la superfamilia de transportadores mitocondriales (de ATP/ADP, de Pi/H^+ , de oxoglutarato/malato, proteína desacoplante) cuyos miembros presentan PM entre los 28 y los 32 kDa (Waker y Runswick, 1993).

En este trabajo se ensayaron algunos protocolos de purificación con la finalidad de aislar y caracterizar separadamente al acarreador de Ca^{2+} mitocondrial de *Phaseolus vulgaris*. Sin embargo, debe advertirse que no obstante estos estudios dan antecedentes sobre las estrategias de purificación del acarreador de mitocondria de planta, solamente se alcanzó una purificación parcial de una proteína cuyos datos experimentales apoyan la idea de ser una enzima de membrana que transporta electroforéticamente al Ca^{2+} . En retrospectiva, nuestra propuesta para aumentar la purificación de dicha proteína membranal es la utilización inicial de un fraccionamiento por isoelectroenfoque preparativo con un intervalo de pH de 3 a 10. Las muestras que se separen de pH 5.0 a 7.5 se podrían juntar para eluirlas en una columna de inmunoafinidad con $\text{IgG}_{\text{riñón}}$. Un paso que podría convenir después de la cromatografía sería un segundo isoelectroenfoque con un intervalo estrecho de pH de entre 5.0 a 8.0. Esto último permitiría una mayor resolución en la separación de las muestras y posiblemente se separarían las bandas de entre 50 y 30 kDa. El siguiente

paso consistiría en determinar las actividades en cada fracción bajo el método de incorporación de proteínas y el transporte de Ca^{2+} en proteoliposomas.

Los avances de este trabajo para aislar al uniportador muestran que no fue posible obtener un mayor grado de purificación que el que se consiguió con otros métodos que se utilizaron en mamíferos. Existe, sin embargo, un grupo que ha conseguido una mayor purificación del uniportador (Zazueta, y col. 1994). Recientemente este grupo purificó derivados del R.R. que presentan una K_i para el transportador de Ca^{2+} de hasta 7 nM (Zazueta y Chávez, comunicación personal). La posibilidad de tener un compuesto altamente selectivo para el acarreador permite utilizar dicho reactivo como herramienta de purificación en cromatografía de afinidad.

Finalmente, el aislamiento del acarreador de calcio en *Phaseolus* ofrece un claro ejemplo en estrategias de separación de proteínas membranales que se agregan espontáneamente cuyo su concentración es alta. Además, se debe subrayar la importancia del isoelectroenfoco preparativo como alternativa para eliminar precipitaciones. Por tanto, proponemos que dicha técnica puede utilizarse exitosamente para aislar y purificar enzima que presenten alto grado de agregación, pero que puedan permanecer a baja fuerza iónica por un corto periodo sin desnaturalizarse.

CONCLUSIONES.

- 1.- El transporte de Ca^{2+} mitocondrial de germen de frijol es electroforético, depende de Pi como anión permeante y no requiere de ADP para aumentar la captación.
- 2.- El transporte de Ca^{2+} es más lento que el bombeo de H^+ por la cadena de transporte de electrones. Este mismo patrón se repite en un sistema reconstituido de proteolipasomas que forman gradiente de H^+ .
- 3.- La cinética del transporte de *Phaseolus vulgaris* es de tipo sigmoideo, con un coeficiente de Hill de 1.75 ± 0.381 . La $K_{0.5}$ fue de $115.55 \pm 17.51 \mu\text{M}$ y la $V_{\text{max}} \text{mg}^{-1}$ es de $38.37 \pm 3.16 \text{ nmol Ca}^{2+} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Este último dato es cuarenta veces inferior a lo que se reporta en mamíferos.
- 4.- El transporte de calcio es sensible al inhibidor rojo de rutenio.
- 5.- El acarreador puede aislarse bajo tres diferentes métodos, sin embargo, el método con mayor rendimiento consistió en un protocolo que combinó isoelectroenfoque preparativo e inmunoquímica. Este método permite obtener una fracción con seis proteínas y una cantidad total de 1 mg. La actividad máxima que se obtuvo de dicha fracción fue de $279.3 \text{ nmol Ca}^{2+} \text{ mg}^{-1} 45 \text{ min}^{-1}$.
- 6.- El análisis densitométrico de las fracciones que se obtuvieron por los tres protocolos de aislamiento involucran la actividad de transporte a una proteína con un PM de 30 kDaltones y con un pI de entre 5.5 a 7.0. Este último dato coincide con lo que observó el grupo de Zazueta para el caso del acarreador de calcio mitocondrial de riñón de rata.

PERSPECTIVAS.

Los resultados que se obtuvieron permiten establecer un protocolo de purificación para el acarreador de Ca^{2+} mitocondrial de *Phaseolus vulgaris*. Este protocolo es susceptible de perfeccionarse con el fin de disminuir el número de contaminantes. Debido a la alta concentración de proteína que se obtiene por medio de la técnica de isoelectroenfoque preparativo, resulta atractivo ensayar la formación de IgY contra la fracción rica en actividad. Por otro lado, el obtener una fracción semipura permitirá el análisis molecular para tener información sobre la secuencia y composición de los residuos aminoácidos, el perfil de hidropatía y la predicción de la posible estructura secundaria. Así también, se permitirá conocer la presencia de componentes no aminoácidos unidos a la proteína como son azúcares y conocer secuencias consenso como los de sitios de unión a calcio.

En el futuro es posible conocer los mecanismos genéticos que se involucran en la síntesis del acarreador y evaluar con mayor exactitud las características cinéticas y la relevancia fisiológica que tiene esta enzima en el metabolismo celular.

BIBLIOGRAFIA:

- Ayres, G.H. (1978) Ionógenos poco solubles: producto de solubilidad. en "Análisis químico cuantitativo. pp: 95-114. Ed. Harla. México.
- Åkerman, K.E.O. (1977) (a) Effect of Mg^{2+} and spermine on the kinetics of Ca^{2+} transport in rat-liver mitochondria. J. Bioenerg. Biomembr. 9:65-72.
- Åkerman, K.E.O. (1977) (b) Effect of cations on the temperature sensitivity of Ca^{2+} transport in rat-liver mitochondria and safranin uptake by liposomes. J. Bioenerg. Biomembr. 9:141-149.
- Åkerman, K.E.O. and Nicholls D. G. (1973) Physiological and bioenergetics aspects of mitochondrial calcium transport. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 95:149-201.
- Åkerman, K.E.O., Wilkstrom M.K.F., y Saris, N.E. (1977) Effect of inhibitors on the sigmoidicity of the calcium ion transport kinetics in rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 464:287-294.
- Åkerman, K.E.O. y Moore, L.A. (1983) Phosphate dependent, ruthenium red insensitive Ca^{2+} uptake in mung bean mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 114:1176-1181.
- Baker, P.F., y Schlaepfer W.W. (1978) Uptake and binding of calcium by axoplasm isolated from giant axons of loligo and mixieda. J. Physiol. Lond. 276:103-125.
- Bragadin, M., Pozzan, T. y Azzone, F. G. (1979) Kinetics of Ca^{2+} carrier in rat liver mitochondria. Biochemistry 18:5972-5978.
- Bygrave, F.L., Reed, K.C. y Spencer, T. (1971) Cooperative interactions in energy-dependent accumulation of Ca^{2+} by isolated rat liver mitochondria. Nature New Biol. 230:89-91.
- Black, S.M., Harikrishna, J.A., Szklarz, G.D. and Miller, W.L. (1994) The mitochondrial environment is required for activity of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, cytochrome P450_{sc}. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:7247-7251.
- Blondin, A. G. (1974) Isolation of a divalente cation ionophore from beef heart mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 56:97-105.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- Carafoli, E.A. (1965) Active accumulation of Sr^{2+} by rat-liver mitochondria. II. Competition between Ca^{2+} and Sr^{2+} and its stoichiometry. *Biochim. Biophys. Acta* 97:99-106.
- Carnieri, E.G.S., Martins, I. S. y Vercesi, A.E. (1987) The mechanism and biological role of calcium transport by plant mitochondria. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 20:635-638.
- Chávez, E., Briones, R., Michel, B., Bravo, C. y Jay D. (1985) Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium transport: Studies with cadmium. *Arch. Biochem. Biophys.* 242:493-497.
- Chávez, E., Zazueta, C., Diaz, E. y Holguín, J.A. (1989) Characterization by Hg^{2+} of two different pathways for mitochondrial Ca^{2+} release. *Biochim. Biophys. Acta.* 986:27-32
- Chen, C. y Lenhinger, A. (1968) Ca^{2+} transport activity in mitochondria from some plant tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 157:183-197.
- Crompton, M., Capano, M., y Carafoli, E. (1976) (a) Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca^{2+} , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca^{2+} overload. *Eur. J. Biochem.* 69: 453-462.
- Crompton, M., Sigel, E., Salzmann, M. y Carafoli, E. (1976) (b) A kinetic study of the energy-linked influx of Ca^{2+} into heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 69:429-434.
- Crompton, M., Ellinger, H., y Costi, A. (1988) Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by organic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* 255, 357-360.
- Davidoff, F. (1974) Effects of guanidine derivatives on mitochondrial function: Ca^{2+} uptake and release. *J. Biol. Chem.* 249:6406-6415.
- Darley-Usmar, V.M., Rickwood, D. y Wilson, M.T. (1987) en "Mitochondria: a practical approach". pp. 1-3. IRE Press. Oxford, England.
- Day, D.A., Bertagnolli, B.L., y Hanson, J.B. (1978) The effect of calcium on the respiratory responses of corn mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 502:289-297.

- Dieter, P. y Marmé, D. (1980) Ca^{2+} transport in mitochondrial and microsomal fractions from higher plants. *Planta* 150:1-8.
- Engvall, E. y Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8: 871-874.
- Enyedi, A., Vorherr, T., James, P., McCormick, D.J., Filoteo, A.G., Carafoli, E., y Penniston, J.T. (1989) The calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts both with calmodulin and with another part of the pump. *J. Biol. Chem.* 264:12313-12321.
- Ferguson, B.I., Reid, S.M., y Romani, J.R. (1985) Effects of low temperature and respiratory inhibitors on calcium flux in plant mitochondria. *Plant Physiol.* 77:877-880.
- Fiskum, G. y Cockrell, R. S. (1978) Ruthenium red sensitive and insensitive calcium transport in rat liver and Ehrlich ascites tumor cell mitochondria. *FEBS Lett.* 92:125-128.
- Fleischer, S., Rouser, G., Fleischer, B., Casu, A. y Kritchevsky, G. (1967) Lipid composition of mitochondria from bovine heart, liver, and kidney. *Lipid Res.* 8:170-180.
- Fleischer, S. and Inui, M. (1989) Biochemistry and Biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18, 333-364.
- Garret, N. E. and Penefsky, H. S. (1975) Interaction of adenine nucleotides with multiple binding sites on beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 250:6640-6647.
- Gemba, M. (1974) Effect of diuretics on ion transport of kidney cortex mitochondria. II. Mode of action of ethacrynic acid on mitochondrial calcium pump. *Japan. J. Pharmacol.* 24:271-277.
- Gunter, T. y Pfeiffer, R.D. (1990) Mechanism by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* 258:C755-C786.
- Gomez-Puyou, A., Tuena G.P.M., Becker, G. y Lehninger L.A. (1972) An insoluble Ca^{2+} -binding factor from rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47:814-819.
- Halina, L. y Nathan, S. (1986) en "The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine". pp. 293-370. Academic press. New York.

- Heaton, G.M., y Nicholls, D.G. (1976) The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient. *Biochem. J.* 156:635-646.
- Hepler, K.P. y Wayne, O.R. (1985) Calcium and plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36:397-439.
- Hinkle, P.C. (1976) in *Mitochondria, Bioenergetics, Biogenesis and Membrane Structure* (Parcker, L. and Gómez-Puyou, A. Eds.), pp. 183-192. Academic Press, New York.
- Hutson, S. M. (1977) Steady state kinetics of energy-dependent Ca^{2+} uptake in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 252:4539-4545.
- Hutson, S. M., Pfeiffer, D.R. y Lardy, H.A. (1976) Effect of cations and anions on the steady state kinetics of energy-dependent Ca^{2+} transport in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 251:5251-5258.
- Jeng, Y.A., Ryan, E.T. y Shammoo, E.A. (1978) Isolation of a low molecular weight Ca^{2+} carrier from calf heart inner mitochondrial membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:2125-2129.
- Jeng, Y.A. y Shamoo, E.A. (1980) The electrophoretic properties of a Ca^{2+} carrier isolated from calf heart inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 255:6904-6912.
- Kapús, A., Szászi, K. Káldi, K., Ligeti, E. y Fonyó, A. (1991) Is the mitochondrial Ca^{2+} uniporter a voltage-modulated transport pathway? *FEBS Lett.* 282:61-64
- Kendrick, N.C. (1976) Purification of arsenazo III, a Ca^{2+} -sensitive dye. *Annu. Rev. Biochem.* 76:487-501.
- Lara, B., López, M.G., Villarroya, M., Gandia, L., Leeman, C., Moran, y M., Garcia, A.G. (1997) A caffeine-sensitive Ca^{2+} store modulates K^{+} -evoked secretion in chromaffin cells. *Am. J. Physiol.* 272:C1211-C1221.
- LaNoue, K.F. y Schoolwerth, A.C. (1979) Metabolite transport in mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 48:871-922.
- Linke, W.F. (1958) Calcium en "solubilities inorganic and metal-organic compounds" Vol.1 pp:495-693. Washington.

- Lotscher, R.H., Winterhalter, H.K., Carafoli, E. y Richter, C. (1980) The energy-state of mitochondria during the transport of Ca^{2+} . *Eur. J. Biochem.* 110:211-216.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Radoll, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Maldonado, E., Moreno, A., Panneerselvam, K., Ostoa-Saloma., Garza-Ramos, G., Soriano-García, M., Pérez-Monfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M. and Gómez-Puyou, A. (1997) Crystallization and preliminary X-ray analysis of Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Protein and Peptide Lett.* 4:139-144.
- Martin, W., Beavis, A. y Garlid, K. (1984) Identification of a 82,000-dalton protein responsible for K^+/H^+ antiport in rat liver mitochondria. *J. Biol.Chem.* 259:2062-2065.
- Martins, S. I., Carnieri, G. S. E. y Vercesi, E. A. (1986) Characteristics of Ca^{2+} transport by corn mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 850: 49-56.
- McMillin-Wood, J., Wolkowicz P.E., Chu, A., Tate, C.A., Goldstone, M.A. yEntman M.L. (1980) Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 591:251-265.
- Mironova D.G., Sirota V.T., Pronevich, A.L., Trofimenko, V.N., Mironov, P.G., Grigorjev, A.P. y Kondrashova, N.M. (1982) Isolation and properties of Ca^{2+} -transporting glycoprotein and peptide from beef heart mitochondria. *J. Bioenerg Biomembr.* 14:213-225.
- Mitchell, P, and Moyle, M. (1969) Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 7:471-484.
- Moore, C. (1971) Specific inhibition of mitochondrial Ca^{++} transport by ruthenium red. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42:298-305.
- Morsell, L.A. y Pereira-Da-Silva, L. (1992) Alterations to the permeability of plant and animal mitochondria submitted to Ca^{2+} releasing agents. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B:569-574.
- Moyle, J. y P. Mitchell (1977) The lanthanide-sensitive calcium phosphate porter of rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 77:136-140

- Murray P.D. (1990) en "Guide to protein purification",. *Methods in Enzymology*. Vol 182 pp 174-539. Academic Press, New York.
- New, R.R.C. (1994) en "Liposomes a practical approach", (New, R.R.C. Eds), pp 1-32. Oxford University Press, England.
- Nicholls, D.G. (1987) "El circuito quimiosmótico de protones", del *Bioenergética*. introducción a la teoría quimiosmótica. pp 71-103. Editorial Reverté, S.A. España.
- Nichols, J.B. y Denton, M.R. (1995) Toward the molecular basis for regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Mol. Cell. Biochem.* 149/150:203-212.
- Noack, E. y Greeff, K. (1971) Inhibition of calcium transport in mitochondria by β -receptor blocking substances and its reactivation by phospholipids. *Experientia Basel* 27:810-811.
- Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramírez, J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. and Pérez-Monfort, R. (1997) Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 244:700-705.
- Papadopoulos, V., Guarneri, P. Krueger, K.E., Guidotti, A. y Costa, E. (1992) Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: Regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:5113-5117.
- Pfeiffer, D.R., Hutson, S.M. Kauffman, R.F. y Lardy H. A. (1976) Some effects of ionophore A23187 on energy utilization and the distribution of cations and anions in mitochondria. *Biochemistry.* 15:2690-2697.
- Polson, A., Wechmar, B. V. y Regenmortel M.H.V.V.(1980) Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Inmmunol. Commun.* 9:475-493.
- Rasmussen, H, (1989) The cycling of calcium as an intracellular messenger. *Sci. Am.* 261:66-73.
- Ramírez, J., Calahorra, M. y Peña, A. (1987) Variations on the "dilution" method for reconstituting cytochrome c oxidase into membrane vesicles. *Annu. Biochem.* 163:100-106.

- Reed, K.C. y Bygrave, F.L. (1974) (a) Accumulation of lanthanum by rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 138:239-252.
- Reed, K.C. and Bygrave, F.L. (1974) (b) The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. *Biochem. J.* 140:143-155.
- Reed, K.C. and Bygrave, F.L. (1975) A kinetic study of mitochondrial calcium transport. *Eur. J. Biochem.* 55:497-504.
- Reyes-Vivas, H., Lopez-Moreno, F. y Chávez, E. (1996) Protective effect of Diethyldithiocarbamate on mercury-induced toxicity in kidney mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol.* 113C: 349-352.
- Romslo, I. y Flatmark. T. (1973) Energy-dependent accumulation of iron by isolated rat liver mitochondria. II, Relationship to the active transport of Ca^{2+} . *Biochim. Biophys. Acta.* 325:38-46.
- Roux, J., McEntire, K., Slogum, D., Cedel, E., y Hale, H. (1981) Phytochrome induces photoreversible calcium fluxes in a purified mitochondrial fraction from oats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 283-287.
- Rossi, C.S., y Lehninger, A. L. (1964) Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of Ca^{++} and phosphate and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 239:3971-3980.
- Rossi, C.S., Vasington, F.D. y Carafoli, E. (1973) The effect of ruthenium red on the uptake and release of Ca^{2+} *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50:846-852.
- Russell, M. y Wilson, S. (1978) In *Plant Mitochondria* eds. Ducet G. y Lance C. (Elsevier, New York), pp. 175-182.
- Ryley, W. y Pfeiffer, D. R. (1985) Relationships between Ca^{2+} release, Ca^{2+} cycling, and Ca^{2+} -mediated permeability changes in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260:12416-12425.
- Scarpa, A., y Azzone. G.F. (1969) Effects of phospholipids in liver mitochondria osmotic properties and binding of cations. *Biochim. Biophys. Acta.* 173:78-85.
- Scarpa, A., y G. F. Azzone. (1970) The mechanism of ion translocation in mitochondria. 4. Coupling of K^{+} efflux with Ca^{2+} uptake. *Eur. J. Biochem.* 12:328-335.

- Scarpa, A. y Graziotti, P. (1973) Mechanisms for intracellular calcium regulation in heart. I. Stopped flow measurements of calcium ion uptake by cardiac mitochondria. *J. Gen. Physiol.* 62:756-772.
- Segel, I. (1975) "Enzyme kinetics" pp. 346-463. John Wiley and Sons Press. New York.
- Selwyn, M. J., Dawson, A. P. y Dunnet, S. J. (1970) Calcium transport in mitochondria. *FEBS Lett.* 10:1-5.
- Silva, P.M.A., Carnieri, G.S.E. y Vercesi, E.A. (1992) Calcium transport by corn mitochondria, evaluation of the role of phosphate. *Plant Physiol.* 98:452-457.
- Sottocasa, G., Sandri, G., Panfilli, E., Bernard, B., Gazzotti, P., Vasington, F. y Carafoli, E. (1972) Isolation of a soluble Ca^{2+} binding glycoprotein from ox liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47:808-813.
- Sokolove, P. M. y Brenza, M.J. (1983) Isolation of a fraction with Ca^{2+} Ionophore properties from rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 221: 404-416.
- Tashmukhamedov, B.A. Gagelgans, A.I. Mamatkulov, K. y Makhmudova, E.M. (1972) Inhibition of Ca^{2+} transport in mitochondria by selective blockade of membrane mucopolysaccharides by hexamine cobaltchloride. *FEBS Lett.* 28:239-242.
- Thayer, W.S. and Rubin, E. (1979) Effects of chronic ethanol intoxication on oxidative phosphorylation in rat liver submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 254:7717-7723.
- Tyson, A.C., Zande V.H. y Green E.D. (1976) Phospholipids as ionophores. *J. Biol. Chem.* 251:1326-1332.
- Uribe, A., Chávez, E., Jiménez, M., Zazueta, C., y Moreno-Sanchez. (1994) Characterization of Ca^{2+} transport in *Euglena gracilis* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1186:107-116.
- Vercesi, A., Reynafarje, B. y Lehninger, A.L. (1978) Stoichiometry of H^+ ejection and Ca^{2+} uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 253:6379-6385.
- Vinogradov, A. y Scarpa, A. (1973) The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 248:5527-5531.

Walker, E.J. y Runswick, J.M. (1993) The mitochondrial transport protein superfamily. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25:435-446.

Zazueta, C., Massó, F., Paez, A., Bravo, C., Vega, A., Montaña, L., Vázquez, M., Ramirez, J., y Chávez, E. (1994) Identification of a 20-kDa protein with calcium uptake transport activity. Reconstitution in a model membrane. *J. Bioenerg Biomembr.* 26:555-562.