

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**EL EFECTO DEL CALCIO EN LA ADENIN
NUCLEOTIDO TRANSLOCASA MITOCONDRIAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Q U I M I C O
P R E S E N T A**

MAGDALENA KLAPP ESCRIBANO

MEXICO, D. F.

1980



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.

	PRESIDENTE	Dra. Ruth Román Palacios
Jurado asignado	VOCAL	Dr. Edmundo Chávez Cossío
originalmente	SECRETARIO	Dra. Marietta Tuena de Gómez Puyou
según el tema	1er. SUPLENTE	Dra. Rocío Salceda Sacanelles
	2do. SUPLENTE	Dr. Blas Lotina

Sitio donde se desarrolló el tema:

Centro de Investigaciones en Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

Sustentante	Magdalena Klapp Escribano
Asesor del tema	Dra. Marietta Tuena de Gómez Puyou
Supervisor técnico	Dr. Armando Gómez Puyou

a Osvaldo

a los JanoKlapp

A G R A ´ D E C I M I E N T O S

La presente tesis se realizó bajo la dirección de los Doctores Armando Gómez Puyou y Marietta Tuena de Gómez Puyou a quienes expreso mi profundo agradecimiento por la ayuda, apoyo y enseñanza que me brindaron durante la preparación y desarrollo de la misma.

Mi sincero reconocimiento al Doctor Edmundo Chávez Co
ssío por sus valiosos consejos, así como al apoyo e impulso que me ha dado durante toda mi carrera.

Mi gratitud al M.C. Arturo Jañovitz, a la M.C. Dolores Lopez, al Dr. José Antonio Holguín, a la Q. Angela Galán, al Lic. Gabino Puga y a la Sra. Silvia Carrillo de Esparza por su ayuda en la elaboración y revisión del presente trabajo.

I N D I C E

	Pág.
INDICE	5
GENERALIDADES	6
INTRODUCCION	30
MATERIAL Y METODOS	35
RESULTADOS	41
DISCUSION	58
ABREVIATURAS	61
BIBLIOGRAFIA	62

GENERALIDADES

Es difícil atribuir el descubrimiento de las mitocondrias a una persona en concreto, sin embargo Kölliger en 1850 (1), fue quizá la primera persona que prestó atención a los gránulos característicamente dispuestos en el sarcoplasma del músculo estriado. Estas mitocondrias recibieron posteriormente, por parte de Retzius en 1898, el nombre de sarcosomas, de nominación que todavía se usa específicamente para las mitocondrias del tejido muscular. El término mitocondria quiere decir gránulo filiforme y fue utilizado por Benda aproximadamente en la misma época (1), aunque no fue universalmente aceptado y de hecho ningún otro gránulo ha recibido tantos nombres, (mitoplastos, sarcosomas, mitocondrias, etc.).

Nuevamente en 1888, Kölliger (1) señaló la existencia de numerosos gránulos globosos en los músculos elevador y depresor de las alas de los insectos observando que se hinchaban en agua, de lo cual dedujo que estas partículas poseían una membrana limitante.

Debido al avance de las técnicas histoquímicas y de coloración supravital (técnicas de coloración de fragmentos de materia viva), se hizo posible la demostración de que las mitocondrias de muy diversos tipos de células contenían fosfolípidos y proteínas (investigaciones hechas por Regaud en 1908) (1), lo que permitió suponer que las mitocondrias posiblemente

te poseyeran una estructura y función específica común en los distintos tipos celulares. En este sentido fue muy notable la obra de Michaelis en 1898 (1), ya que con el colorante verde de Jano B., demostró que ciertos componentes (mitocondrias) de las células vivas eran capaces de producir un cambio de oxidación-reducción en el colorante, y diez años más tarde, Kingsbury llamó la atención acerca de la posibilidad de que las mitocondrias fueran los lugares donde se llevara a cabo la respiración celular.

Durante aquellos años, la mayoría de las teorías que existían con respecto a la función de las mitocondrias estaban relacionadas con la diferenciación celular o con las características hereditarias.

Siguiendo lo propuesto por Kingsbury (1912) (1), Warburg en 1913 (1) observó que la respiración estaba asociada a elementos granulares e insolubles de la estructura celular, que él recogía a partir de filtrados de dispersiones tisulares, pero desafortunadamente no los relacionó con las mitocondrias.

En 1914 Lewis y Lewis (1) hicieron observaciones acerca del número, tamaño, orientación y distribución de las mitocondrias en muchos tipos celulares. De tales observaciones, las mitocondrias surgieron como componentes importantes y universales de las células aeróbicas, su número y actividad re-

fleja el estado nutricional, metabólico o endocrino de la célula y en consecuencia finalmente, se estableció su función respiratoria.

ESTRUCTURA DE LAS MITOCONDRIAS. MEMBRANAS MITOCONDRIALES

Las mitocondrias se hallan localizadas en las proximidades de las estructuras que requieren ATP, su número es relativamente constante y característico para cada tipo de célula por ejemplo: una célula de hígado de rata contiene cerca de 800 mitocondrias y se ha visto que poseen una longitud de $2\mu\text{m}$ y poco menos de $1\mu\text{m}$ de ancho (dimensiones muy semejantes a las bacterias).

Están constituidas por una membrana externa lisa y algo elástica y otra interna que tiene pliegues o invaginaciones llamadas crestas formando un compartimiento que encierra la matriz, que es gelatinosa y contiene cerca del 50% de proteína, parte de la cual se halla organizada en un retículo ligado a la superficie interna de la membrana interior; además, contiene DNA y ribosomas.

Han sido propuestos varios modelos de membrana y el más aceptado actualmente es el de mosaico fluido de lípidos y proteínas globulares de Singer (2), que se puede utilizar para la estructura de las membranas mitocondriales. En el modelo de Singer las proteínas que están asociadas con las membranas caen dentro de dos categorías generales: las periféricas

o extrínsecas y las integrales o intrínsecas.

- a) Las proteínas periféricas son aquellas que se disocian relativamente fácil de las membranas con tratamientos suaves como quelantes y fuerza iónica, y por lo tanto, deben estar unidas a las membranas débilmente.
- b) Las proteínas integrales son aquellas que requieren tratamientos más drásticos para que sean disociadas de las membranas, con reactivos como detergentes, solventes y caotrópicos

Los lípidos y las proteínas globulares integrales están arregladas en un patrón alternante de mosaico a través de la membrana. Las porciones hidrofóbicas de los lípidos y una fracción grande de los residuos no polares de aminoácidos de las proteínas no tienen contacto con el agua y forman principalmente el interior hidrofóbico de la membrana, mientras que los grupos iónicos de los lípidos y los residuos hidrofílicos de las proteínas están en contacto directo con el agua, predominantemente en la superficie exterior de las membranas, los carbohidratos, ya sean glucoproteínas o glucolípidos están completamente en contacto directo con la fase acuosa. Este arreglo favorece las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas entre los lípidos, proteínas y oligosacáridos de la membrana.

Los fosfolípidos de este modelo de mosaico están arreglados primariamente en forma de una bicapa similar a la propuesta por Davson y Danielli (3), pero con la diferencia de que en el modelo del mosaico los grupos iónicos de los lípidos están expuestos a la fase acuosa y la bicapa no es continua, porque se encuentra interrumpida por las proteínas. Existe un alto grado de heterogeneidad entre las cadenas de ácidos grasos de los lípidos con respecto a la longitud de la cadena y grado de insaturación. Para muchas membranas, especialmente las que no contienen colesterol, como la membrana interna de la mitocondria, las cadenas de ácidos grasos están en el estado fluido en condiciones fisiológicas. Estas consideraciones sugieren que en el interior de la membrana las porciones lipídicas de la estructura de mosaico pueden ser como una solución líquida en la cual estén disueltas otras estructuras hidrofóbicas tales como el colesterol y tal vez algunos de los residuos hidrofóbicos de las proteínas integrales.

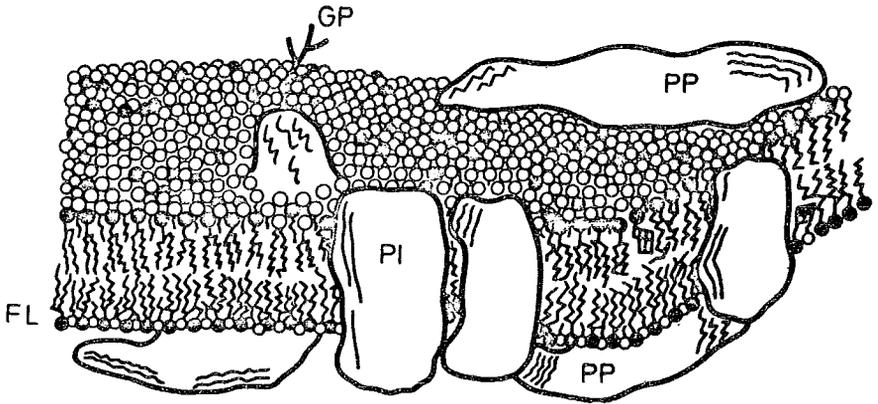
En el modelo del mosaico se considera que la mayor parte de las proteínas son globulares semejanado proteínas solubles simples, que están intercaladas en el interior de la membrana y que tienen además una función que consiste en mantener la estructura de la membrana. El grado de penetración de una proteína globular en el interior de la membrana y en particular, los casos donde la atraviesa completamente, depende del tamaño y otras propiedades estructurales de la proteína.

Kotyk (4) ha esquematizado la membrana del mosaico fluido tal como se muestra en la figura A (pág. 12).

Las membranas mitocondriales externa e interna difieren en su ultraestructura y composición; la superficie interna de la membrana interna se halla cubierta de partículas esféricas, espaciadas regularmente, de 8 a 9nm de diámetro y conectadas a la membrana por un estrecho vástago.

Es posible separar la membrana externa dejando intacta la interna y la matriz mitocondrial, a esta preparación se le denomina mitoplasto. En la membrana interna se encuentran las enzimas de la cadena oxidativa: deshidrogenasas, citocromos b, c, c₁, a y a₃ y la OS-ATPasa que constituye el segmento fosforilante de la mitocondria. La membrana externa posee actividades enzimáticas características, siendo la más relevante la de la monoamino oxidasa que sirve como enzima marcadora de esta membrana que contiene un 50% de lípidos, a diferencia de la membrana interna que contiene un 20% de los mismos y un 80% de proteínas, además de ser rica en cardiolipina que es el lípido característico y del cual carece la membrana externa que contiene colesterol. El espacio situado entre las membranas contiene también enzimas específicas como la adenilato cinasa. La matriz contiene la mayor parte de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

La membrana interna de las mitocondrias contiene alre-



- GP Glucoproteínas
- PP Proteínas periféricas
- PI Proteínas integrales
- FL Fosfolípidos

FIGURA A. ESQUEMA DE LA MEMBRANA DEL MOSAICO FLUIDO (4)

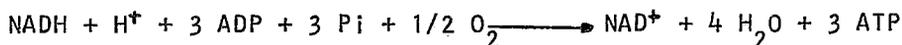
dedor de 60 diferentes proteínas con variadas actividades biológicas, algunas de ellas incluidas en la bicapa fosfolipídica (5, 6, 7).

Es posible preparar partículas submitocondriales capaces de llevar a cabo el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Estos fragmentos de membrana resellados invertidos catalizan la fosforilación oxidativa solamente en el caso de que la membrana se halle completamente cerrada, ya -- que se necesita una estructura vesicular intacta para que se produzcan los fenómenos de conservación de la energía.

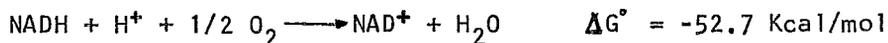
FOSFORILACION OXIDATIVA

Entre 1949 y 1951, Lehninger aportó las pruebas experimentales tendientes a demostrar que el transporte de electrones desde el NADH hasta el oxígeno, es la fuente directa de la energía utilizada para la fosforilación acoplada del ADP.

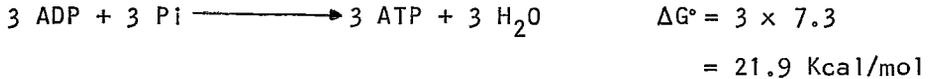
La ecuación global de la síntesis del ATP acoplado a la cadena respiratoria es:



que puede separarse en un componente exergónico:



y un componente endergónico:



La cadena respiratoria es un sistema que efectúa, en una serie de descensos sucesivos de energía, la liberación de la energía libre total que se produce cuando un par de electrones se desplaza desde el NADH hasta el oxígeno ($E'_0 = 1.14\text{V}$) proceso que rinde 52.7 Kcal de energía libre por átomo de oxígeno reducido.

Los substratos reducidos ceden electrones en dos sitios de la cadena de transporte de electrones:

- a) A nivel de la NADH deshidrogenasa, y
- b) A nivel de la coenzima Q.

Algunos componentes de los sistemas de transporte de electrones y ATPasa están orientados vectorialmente a través de la membrana interna mitocondrial de acuerdo a los principios del acoplamiento quimiosmótico (8). Hay evidencia de que los tres sitios de acoplamiento de la cadena respiratoria el sistema de ATPasa y la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa, son capaces de generar un gradiente de protones y/o un potencial de membrana (negativo adentro) a través de la membrana (9).

Existen tres regiones de acoplamiento de la cadena respiratoria donde ocurre suficiente caída de voltaje ($\geq 0.16 \text{ V}$)

para que se lleve a cabo la síntesis de ATP. Estas son:

- a) Entre la NADH deshidrogenasa y la coenzima Q.
- b) Entre el citocromo b y el citocromo c.
- c) Entre el citocromo c y el oxígeno.

estas regiones de la cadena son las que participan en la conservación de la energía. Ver figura B (pág. 16).

El sistema fosforilante ATPasa se localiza en el interior de la membrana interna y está formado por un segmento catalítico (F_1) y un segmento membranal (F_0). La F_1 está unida al segmento hidrofóbico o F_0 por medio de dos proteínas, conocidas como la OSCP* (f_5) y la F_6 (Fc_2). El segmento mitocondrial que ha sido aislado con el nombre de F_0 o proteína hidrofóbica provee el canal de protones. Este sistema de ATPasa acopla la síntesis o hidrólisis de ATP con la translocación de protones a través del canal y es un proceso reversible dependiendo de la dirección del gradiente de protones. (10).

Hay inhibidores específicos para ciertos puntos de la cadena que han ayudado al estudio del transporte de electrones, uno muy importante es la rotenona, un insecticida extremadamente tóxico que actúa como veneno para peces y otro el amital de sodio que es un barbitúrico, ambos bloquean la transferencia de electrones del NAD al citocromo b; el antibiótico antimicina A bloquea la transferencia de electrones

* Ver abreviaturas

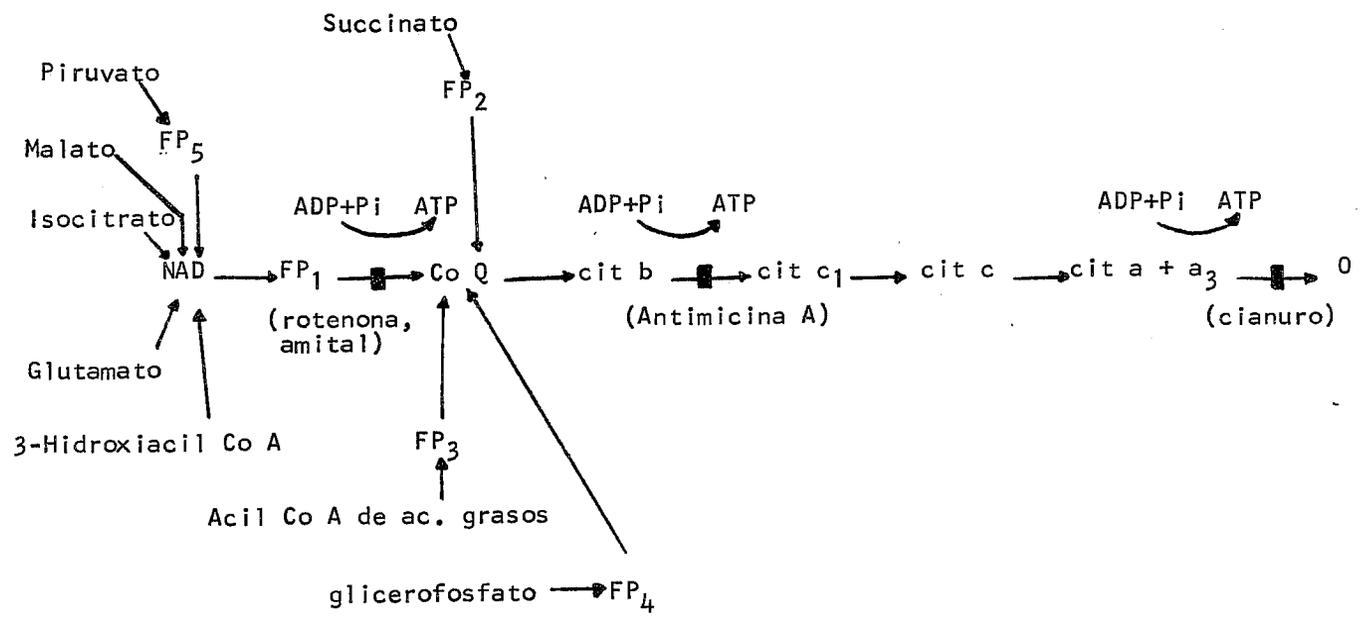


FIGURA B. CADENA RESPIRATORIA (5)

del citocromo b al c y el cianuro, bloquea el paso terminal - del citocromo a + a₃ al oxígeno.

La ecuación global para la fosforilación del ADP en la cadena respiratoria (pág. 13), indica que el fosfato y el ADP son necesarios para acoplar el proceso de transporte de electrones desde el NADH hasta el oxígeno con la síntesis de ATP. La velocidad máxima de transporte de electrones se alcanza en las mitocondrias intactas cuando hay fosfato y ADP en el medio de suspensión. En ausencia de ADP, pero en presencia del sustrato, la velocidad de respiración es baja y no se produce fosforilación debido a la inexistencia de aceptor de fosfato, esta situación se conoce como estado 4 de la respiración y es el estado basal de la cadena respiratoria, al añadir una cantidad conocida de ADP a este sistema, el consumo de oxígeno experimenta un incremento hasta un valor máximo que coincide con que el ADP añadido se fosforila y produce ATP, a este estado se le llama respiración activa o estado 3. Cuando se ha fosforilado todo el ADP añadido, la velocidad de consumo del oxígeno desciende, y vuelve a la velocidad del estado 4. Este fenómeno de incremento en la velocidad de transporte de electrones controlada por la concentración de ADP, se llama control por el aceptor o control respiratorio.

Cuando las mitocondrias se hallan envejecidas o lesionadas por un mal manejo de las mismas durante su preparación,

pierden su capacidad para fosforilar el ADP y no presentan -- control respiratorio.

La ultraestructura de las mitocondrias experimenta notables alteraciones morfológicas reversibles, que son el resultado de las transiciones entre los estados respiratorios 4 (sin ADP) y 3 (con exceso de ADP). Estas transiciones se pueden esquematizar como se ve en la figura C, (pág. 19).

La fosforilación oxidativa resulta influida por cierto número de agentes químicos que pueden agruparse en tres clases principales:

- a) Los desacoplantes, que permiten el transporte electrónico, pero impiden la fosforilación del ADP a ATP; es decir, desacoplan a las reacciones que producen energía de las que la conservan. Su característica es que estimulan la velocidad de consumo de oxígeno de las mitocondrias intactas en ausencia de ADP y provocan un aumento de actividad hidrolítica sobre el ATP o actividad ATPásica, que en ausencia de desacoplantes, es muy baja. Siguiendo la teoría quimiosmótica se dice que actúan disipando el gradiente de protones generado durante la óxido reducción, ya que promueven el paso de estos a través de la membrana mitocondrial que normalmente es impermeable a dichos iones. Ejemplos:

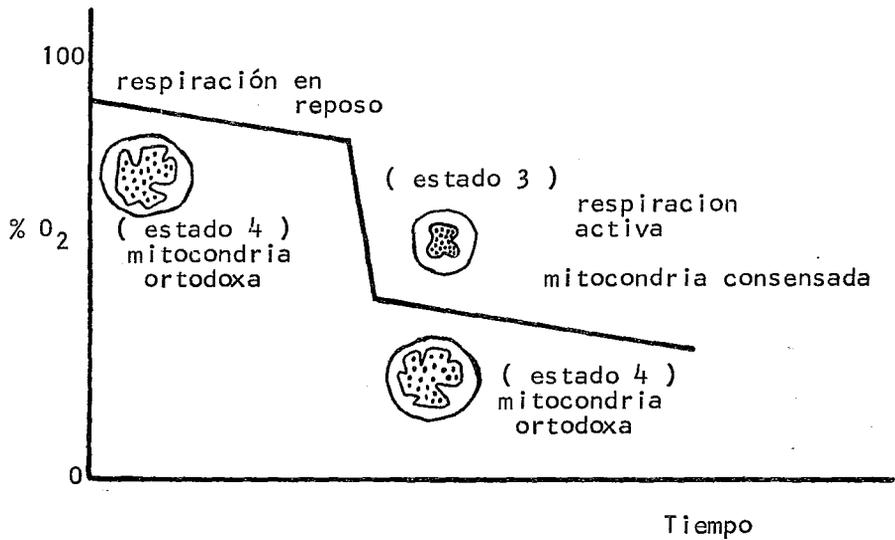


FIGURA C. Esquema de las alteraciones morfológicas de las mitocondrias entre las transiciones de los estados respiratorios 3 y 4 . (5, 11)

FCCP*, DNP*, etc.

- b) Los inhibidores de la fosforilación que impiden la fosforilación del ADP para dar ATP y en consecuencia, la estimulación del consumo de oxígeno por el ADP. Su mecanismo de acción se ejerce a nivel de la ATPasa ($F_0 - F_1$). Ejemplos: DCCD*, oligomicina venturicidina, etc.
- c) Los ionóforos, los cuales son moléculas que incrementan la permeabilidad de los iones acarreándolos a través de las barreras lipídicas de la membrana formando complejos liposolubles con los iones. Pueden ser de dos tipos:
- 1) Los acarreadores móviles que forman un complejo ión metálico-ionóforo y de esta manera atraviesan la membrana. Ejemplos: valinomicina, etc.
 - 2) Los formadores de canales que son moléculas -- que incrementan la permeabilidad de los iones alterando la estructura de la membrana. Estos compuestos se combinan uno con otro o con ciertos lípidos de la membrana dentro de ésta, rompiendo la continuidad de la bicapa y creando un canal acuoso para la libre difusión de iones (12). Ejemplos: gramicidina, etc.

* Ver abreviaturas

MECANISMO DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA

Existen dos hipótesis para explicar el mecanismo general del acoplamiento entre las reacciones de óxido-reducción y las de fosforilación:

1. Teoría Quimiosmótica postulada por Peter Mitchell en 1961
Esta teoría en contraste con la hipótesis química postulada por Slater en 1954 niega la existencia de cualquier intermediario químico común que acople las reacciones productoras con las consumidoras en la fosforilación oxidativa. En su lugar propone Mitchell que la existencia de un gradiente electroquímico de iones H^+ a través de la membrana interna de la mitocondria, es la forma de energía producida por el transporte de electrones y utilizada para la síntesis del ATP. La membrana constituye una parte importante de este mecanismo, pero es indispensable que se encuentre intacta y en forma de una vesícula cerrada para que se forme el gradiente de protones y se utilice en la fosforilación.

Mitchell postula que la función de los transportadores de electrones en la cadena respiratoria es la de actuar como un sistema de transporte activo o "bomba" para transportar iones H^+ al exterior de la mitocondria desde la matriz mitocondrial y a través de la membrana interna, generando de este modo, una distribución asimétrica de iones H^+ debido a la impermeabilidad de la membrana a los mis-

mos. Los componentes de la cadena de transporte de electrones están orientados en la membrana interna de tal manera que favorecen la formación de un gradiente de protones. Se considera que el gradiente electroquímico que se establece de este modo, impulsa la síntesis del ATP en el interior de la ATPsintetasa, provocando la deshidratación del ADP y del fosfato. La cadena de transporte de electrones convierte la energía de óxido-reducción en la energía de un gradiente electroquímico de iones H^+ , la energía libre almacenada en tal gradiente es una función de la concentración relativa de iones H^+ a través de la membrana, se le ha llamado fuerza protón motriz. El gradiente electroquímico rico en energía de los iones H^+ , es utilizado para provocar la formación de ATP a partir de ADP y fosfato, mediante una reacción vectorial en la que interviene el complejo ATPasa (F_0-F_1) de la membrana interna y posiblemente los cambios conformacionales de la F_1 . (13).

2. Hipótesis conformacional postulada por Boyer:

Esta hipótesis postula que la energía producida en el transporte electrónico, se conserva en forma de un cambio conformacional en la molécula del factor acoplante (ATPasa F_1). Dicho estado de conformación de elevada energía, es el resultado de un desplazamiento dependiente de la energía, en el número y la localización de los enla

ces débiles tales como enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas que mantienen la conformación tridimensional de una proteína. Se ha propuesto que la energía contenida en esta conformación "energizada" sería empleada para provocar la formación de ATP a partir de ADP y fosfato, consecuentemente la proteína transformadora de energía experimentaría una reversión a su estado de conformación original, de bajo contenido energético. Esta teoría postula que un número de enlaces no covalentes y débiles de una macromolécula actúan como intermediarios o transportadores de energía para la formación de ATP. (14)

TRANSPORTE DE IONES A TRAVES DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL

El transporte es un proceso mediante el cual un metabolito es llevado de un compartimiento a otro a través de una membrana. (15). Existen diferentes términos que definen el transporte:

a) Captación

Es el proceso que comprende la remoción del substrato del medio, su adsorción y translocación consecuente, con o sin modificaciones químicas.

b) Difusión simple

Es el movimiento de un soluto a favor de un gradiente de concentración.

c) Difusión facilitada

Se distingue de la difusión simple por la interacción del sustrato con un componente de la membrana, se puede observar la cinética de saturación y la estereoespecificidad, y la velocidad es mayor de lo que se esperaría para la difusión pasiva a través de la fase lipídica. Sin embargo por definición, el proceso no necesita energía y resulta de un equilibrio del sustrato a través de la membrana a favor del potencial electroquímico.

d) Transporte mediado por acarreador

Es un fenómeno que resulta en la acumulación de nutrientes y metabolitos en contra de un gradiente de concentración. Este tipo de transporte se lleva a cabo por medio de proteínas especializadas o grupos de proteínas específicas para algunos metabolitos que realizan el transporte y exhiben una cinética de saturación.

e) Transporte activo

Se define como un proceso que resulta del movimiento de una sustancia de una región de bajo potencial electroquímico a otra de alto potencial electroquímico; el movimiento en contra del gradiente de potencial electroquímico requiere de energía. El uso de este término se ha restringido a las translocaciones que están acopladas directamente con las reacciones de H_i

drólisis de ATP, como la ATPasa Na^+K^+ .

f) Translocaciones primarias

Son aquellas en las que la translocación está unida directamente con una reacción bioquímica y puede ser de dos tipos:

1. Translocación de grupos

Generalmente utilizada para describir el resultado de una acción catalizada por un sistema enzimático orientado a través de una membrana. Ocurre frecuentemente modificación química del sustrato. Muchas veces no se puede demostrar un cambio químico del sustrato y entonces se atribuye la acumulación al transporte activo. Ejemplo: Transaminasa glutámico oxaloacética.

2. Translocación de solutos ligados a enzimas

Es un proceso en el cual el sustrato por sí mismo no participa en el intercambio de uniones covalentes, pero es translocado como resultado de tal reacción.

g) Translocaciones secundarias

No están unidas directamente a reacciones químicas o metabólicas, pero pueden estar acopladas secundariamente. Pueden ser de tres tipos:

1. Transporte unidireccional.

Es el más sencillo de todos, se transloca un solo

substrato a través de la membrana de acuerdo con su potencial electroquímico.

2. Cotransporte

Se compone de reacciones en las cuales dos substratos son equilibrados a través de la barrera osmótica, de tal manera que la translocación de un soluto está acoplada a la translocación del otro en la misma dirección. En este caso, un gradiente electroquímico, el cual impulsa el movimiento de un substrato (Na^+ o H^+ p.e) puede dirigir el movimiento de otro substrato (azúcar o aminoácido), el cual utiliza el mismo acarreador aunque el último se mueva en contra de su propio potencial electroquímico.

3. Transporte bidireccional

Está formado por reacciones en las cuales dos solutos se equilibran a través de una barrera de tal manera que la translocación de un soluto está acoplada a la translocación del otro en la dirección opuesta. Es importante reconocer que éstas no son situaciones meramente hipotéticas, por lo menos el transporte unidireccional y bidireccional han sido observados en antibióticos conductores de iones. (Valinomicina, nigericina).

La membrana externa mitocondrial es libremente permeable

a la mayor parte de los solutos de alto peso molecular, a diferencia de la membrana interna que tiene una permeabilidad altamente selectiva. Para algunos de los sistemas de transporte mitocondrial existen inhibidores específicos.

Un aspecto importante de la hipótesis quimiosmótica es el requerimiento de acarreadores específicos en la membrana para la difusión de los metabolitos. Más que postular la entrada de metabolitos a la mitocondria por difusión simple, proceso que disiparía el gradiente electroquímico, Mitchell propone la existencia de acarreadores de intercambio-difusión. Estos acarreadores se postula que pueden intercambiar estequiométricamente un metabolito externo, un OH^- , un H^+ o un catión por un metabolito interno, un OH^- , un H^+ , o un catión, de tal manera que el gradiente electroquímico resultante del flujo de electrones no se altere dramáticamente. (11).

Hay sistemas de transporte pasivos de metabolitos que en ausencia de respiración, transportan metabolitos a favor de los gradientes de concentración y en dirección favorable al equilibrio termodinámico a través de la membrana (p.e. el transportador de glucosa de los eritrocitos). Estos sistemas pueden transportar sus substratos en contra de gradientes de concentración, si se hallan acoplados al transporte de electrones como fuente de energía. La energía que se deriva de este transporte a su vez puede impulsar la formación de un gradiente de -

H^+ a través de la membrana mitocondrial. El gradiente de H^+ - así generado, puede utilizarse para transportar algunos metabo- litos en contra de otros gradientes tanto hacia el interior co- mo hacia el exterior de la mitocondria (p.e. el transportador de ADP-ATP en las mitocondrias).

Las mitocondrias utilizan parte de su energía para el - transporte de ciertos metabolitos o iones minerales a través - de la membrana mitocondrial contra gradientes de concentración. Por ejemplo, pueden acumular algunos cationes, particularmente calcio, en contra del gradiente, en un proceso que se halla -- energéticamente acoplado con la generación del gradiente de H^+ . La acumulación de calcio va acompañada por la incorporación de una cantidad equivalente de fosfato. Por cada par de electro- nes que pasan desde el NADH hasta el oxígeno, se acumulan seis iones de calcio, procedentes del medio; dos por cada sitio de acomplamiento de la cadena respiratoria (NAD-Q), (b-c) y ----- (a-a₃-O).

Cuando las mitocondrias acumulan calcio de este modo, - no se produce la fosforilación oxidativa del ADP. La energía liberada por el transporte de electrones puede emplearse para llevar a cabo la acumulación de calcio o la síntesis de ATP, - pero no ambas simultáneamente. El transporte de calcio en las mitocondrias es inhibido por el complejo metálico rojo de ru- - tenio (16, 17), así como el lantano y otros cationes del tipo

de los lantánidos (18).

Las mitocondrias pueden acumular grandes cantidades de calcio del medio durante el transporte de electrones. Se sabe que la acumulación de calcio estimula la respiración mitocondrial en forma cíclica y estequiométrica, de tal manera -- que la translocación de dos iones de calcio producen una estimulación del consumo de oxígeno equivalente a una molécula de ADP. La acumulación de calcio durante el transporte de electrones va acompañada de una salida de H^+ (19); en ausencia de fosfato o algún otro anión permeante salen dos H^+ por cada -- calcio acumulado (20). Cuando se añade en ausencia de iones permeantes que lo acompañen, se une a la membrana interna mitocondrial y solo cuando hay aniones permeantes aparece el -- calcio acumulado en la matriz junto con el anión.

Esta acumulación de calcio dependiente de la respiración puede ser un proceso biológico normal, basándose en la gran afinidad de la mitocondria por el calcio, que excede la del ADP. De hecho, cuando una mezcla equimolar de calcio y ADP se añade a mitocondrias intactas de hígado de rata, aún en concentraciones fisiológicas bajas, primero acumulan calcio que fosforilan ADP; no se forma ATP hasta que todo el calcio añadido ha sido acumulado.

I N T R O D U C C I O N

La membrana interna que rodea a la matriz mitocondrial es selectivamente permeable a un número limitado de aniones y cationes debido a la existencia de translocadores específicos. Diferentes moléculas generadas dentro de las mitocondrias son exportadas hacia el citosol a través de estos sistemas de transporte específicos o translocadores. Existe en la membrana mitocondrial un translocador específico para ADP y ATP que es la adenín nucleótido translocasa, su función en la célula es importar ADP del citosol y exportar de la mitocondria el ATP generado en la fosforilación oxidativa. Este sistema de transporte ha sido investigado durante los últimos quince años debido a su importancia, ya que es una reacción esencial para transferir la energía generada en la fosforilación oxidativa a los procesos extramitocondriales, además de constituir la unión entre las reacciones de transferencia de fosfato intra y extra mitocondriales.

El translocador de los adenín nucleótidos fue el primer sistema de transporte de aniones, identificado en mitocondrias y estudiado en detalle, y esto fué posible gracias al uso de su inhibidor específico, el atractilósido, que inhibe la fijación de ADP externo a la mitocondria (21).

El ADP o el ATP son transportados a través de la membrana interna de la mitocondria por un mecanismo de intercambio-difusión deducido de los experimentos de incubación con

14C-ADP o 14C-ATP en los que el nucleótido marcado es captado por éstas, sin que existan cambios en el contenido total interno de los adenín nucleótidos debido a que por cada molécula de ADP o ATP que entra a la mitocondria, hay una molécula de ADP o ATP que sale de la misma. La adenín nucleótido translocasa en mitocondrias acopladas cataliza un intercambio asimétrico de ADP externo por ATP interno.

Los estudios cinéticos de la translocación de los adenín nucleótidos se realizan por el método de detener la reacción con un inhibidor específico (descrito en material y métodos) (22, 23, 24). Existen tres inhibidores específicos que se usan normalmente en los experimentos de transporte de adenín nucleótidos: el atractilósido, el carboxiatractilósido y el ácido bongkréquico. Los dos primeros son glucósidos cuya aglicona es un diterpeno y ambas moléculas contienen dos grupos sulfato y un residuo de ácido isovalérico, el carboxiatractilósido difiere del atractilósido por un grupo carboxilo en el C-4 del núcleo diterpénico, además de que es un inhibidor no competitivo, en tanto que el atractilósido es un inhibidor competitivo para el transporte de los adenín nucleótidos. (Ver figura D pág. 32) (25).

El ácido bongkréquico es un inhibidor incompetitivo que es permeable a la membrana interna mientras que el atractilósido y el carboxiatractilósido no lo son, y permanecen --

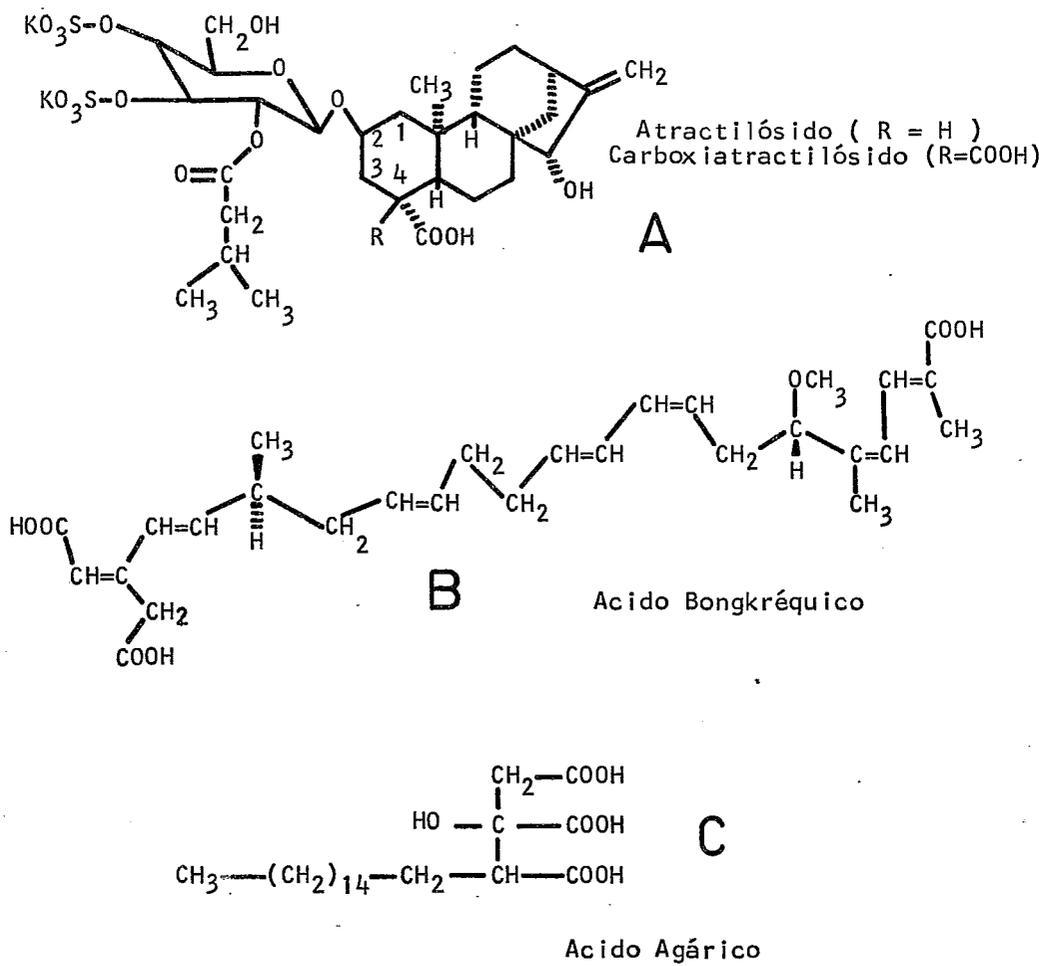


FIGURA D. Estructuras de (A) Atractilósido y Carboxiatractilósido, (B) Acido Bongkréquico y (C) Acido Agárico. (25, 26)

unidos a la superficie externa de la misma.

Recientemente se ha reportado que el ácido agárico (ácido α cetil cítrico), también puede actuar como un inhibidor competitivo en el transporte de los adenín nucleótidos (26, - 27) Ver figura D (pág. 32).

Los estudios cinéticos de la adenín nucleótido translocasa muestran que es posible recambiar totalmente los nucleótidos de la matriz mitocondrial por nucleótidos externos con una estequiometría de 1:1 (28, 29).

Respecto a la especificidad, solamente se transportan ADP y ATP que compiten el uno con el otro, por lo cual es posible visualizar la función de la translocasa en la célula como el resultado de la transferencia al interior de la mitocondria del ADP que se forma en el citosol proveniente de las -- reacciones que consumen ATP, difundándose libremente a través de la membrana externa mitocondrial hasta el espacio intermembranal en donde es atrapado preferencialmente por la adenín nucleótido translocasa para ser fosforilado por el sistema de fosforilación oxidativa en el interior de la matriz mitocondrial y regresar como ATP al citosol por la misma translocasa.

La captación preferencial de ADP en mitocondrias sintetizando ATP por la fosforilación oxidativa da por resultado - que:

- a) La adenín nucleótido translocasa juegue un papel -- central en la fosforilación oxidativa importando -- ADP y exportando ATP.
- b) La velocidad de la respiración mitocondrial esté go bernada por la relación de ADP/ATP externa (30).
- c) El ADP y el ATP sean distribuidos asimétricamente - en los dos lados de la membrana mitocondrial; la re lación ATP/ADP es mayor afuera de la mitocondria -- que adentro. Esta diferencia entre las reacciones de ATP/ADP encontradas in vitro también han sido de mostradas en hígado de rata perfundida y en células intactas de hígado de rata (25).

Basados en las observaciones previas que demostraron - que el calcio externo estimula el intercambio de ATP (31, 32) y observando que existe una relación entre el transporte de - adenín nucleótidos y la acumulación de calcio dependiente de la respiración (33); en este trabajo se trató de estudiar en - detalle; la posible existencia de un mecanismo de interacción del calcio interno y la adenín nucleótido translocasa para -- ver si esta interacción podía ejercer un papel regulador de - la entrada de los adenín nucleótidos a la mitocondria.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

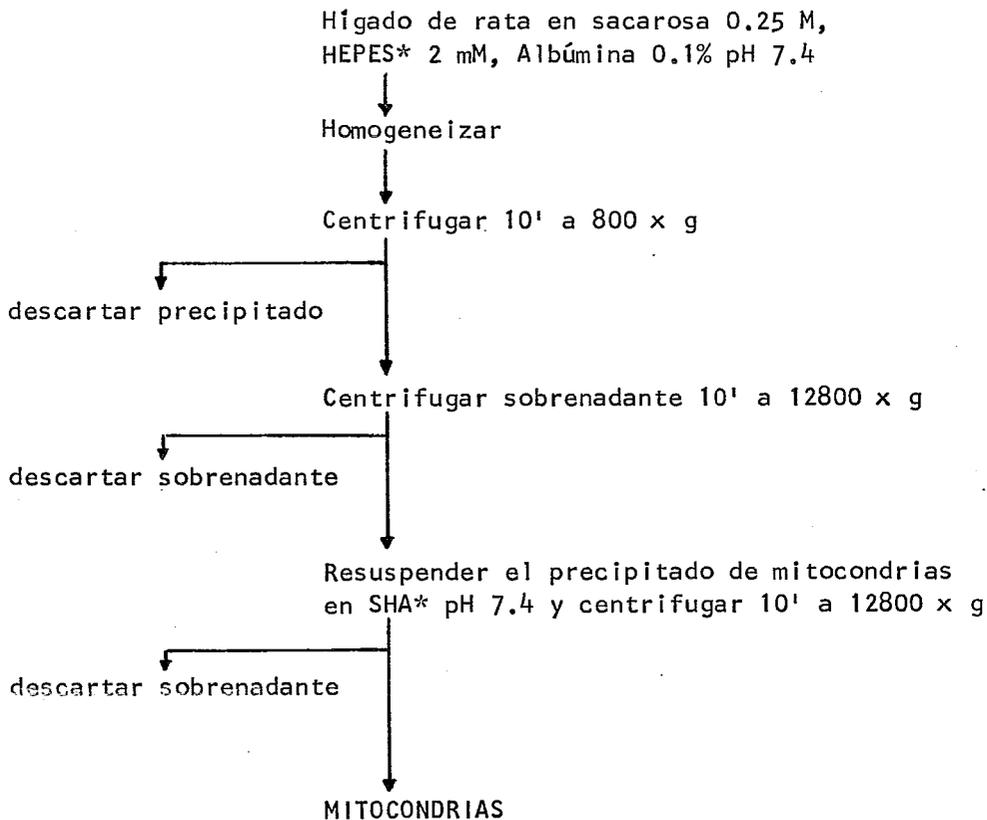
Las mitocondrias de hígado de rata fueron preparadas - siguiendo el método de Schneider y Hogeboom (34).

Se utilizaron ratas albinas de la cepa Wistar proporcionadas por el Bioterio del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, alimentadas ad libitum con Purina Chow, sin ayuno previo al sacrificio. Los animales se sacrificaron por golpe en la cabeza y extracción inmediata del hígado, el cual se homogeneizó en un homogeneizador de Potter aproximadamente durante un minuto en una solución de sacarosa 0.25 M, HEPES* 2mM, albúmina 0.1% pH 7.4 en una relación de 1:10 peso/volumen.

El homogeneizado se centrifugó durante diez minutos a 800 x g en una centrífuga Sorvall RC-2B y se descartó el precipitado, el sobrenadante se centrifugó a 12800 x g durante diez minutos y se descartó el sobrenadante, el precipitado -- que son las mitocondrias se lava por resuspensión en un medio de SHA* pH7.4 y se recentrifuga por diez minutos a 12800 x g, el precipitado final se resuspende en SHA* a una concentración de 60 mg de proteína por mililitro.

* Ver abreviaturas

Este método se puede ver esquematizado a continuación:



*Ver abreviaturas (pág. 61)

En algunos experimentos se utilizó como medio de aislamiento de las mitocondrias 180 mM manitol, 70 mM sacarosa, 10 mM tris-HCL, pH 7.4. Los resultados obtenidos utilizando ambos medios demuestran que no existe diferencia.

La actividad de la translocasa se midió por dos procedimientos:

- a) El método de paro por inhibidor y,
- b) Filtración a través de filtros Millipore

en ambos se deja que las mitocondrias se carguen internamente con los nucleótidos marcados (^{14}C -ATP o ^3H -ADP).

- a) Método de paro por inhibidor

Los experimentos se realizaron con 30 mg de proteína mitocondrial a los que se les añadió aproximadamente 1 μCi de ^{14}C -ATP ó ^3H -ADP libre de acarreador dejando que se equilibren durante 60 minutos - en hielo posteriormente se diluyeron con aproximadamente 40 ml de SHA* y se centrifugaron 10' a --- 10000 x g, se descartó el sobrenadante y se limpiaron las paredes del tubo de tal manera que no quedara nada de medio de aislamiento SHA*. El paquete de mitocondrias se resuspendió en el medio de aislamiento SHA* a una concentración de 25 mg de proteína por mililitro.

Las mitocondrias (8 mg de proteína) marcadas con los adenín nucleótidos radioactivos se añadieron a 4.0 ml. de medio

* Ver abreviaturas

de incubación que contenían 0.25 M manitol, 0.70 M sacarosa, 0.01 M glutamato de sodio, y 0.01 M malato de sodio. A este medio de incubación se le añadieron distintas concentraciones de calcio como se señala en los resultados.

Una vez añadidas las mitocondrias a la cubeta que contenía el medio anterior se equilibraron a la temperatura ambiente durante dos minutos y medio, después de los cuales se transfirieron a un baño de hielo (0°C) durante treinta segundos y se añadió el adenín nucleótido frío (0.4 mM), para iniciar el intercambio; después de 20 segundos de transcurrido - éste, se tomó una alícuota de 0.5 ml y se transfirió a un tubo que contenía 0.1 ml. de atractilósido 0.1 mM para detener la reacción de recambio. De esta suspensión se tomó una alícuota de aproximadamente 200 μ l. y se centrifugó en una microcentrífuga Beckman a máxima velocidad durante tres minutos para separar las mitocondrias del medio de incubación. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 100 μ l. y se añadió a un vial que contenía 5 ml. de líquido de centelleo Bray y se midió su radioactividad en un contador de centelleo Packard Tri Carb. Ver figura E (pág. 39)

Para determinar la cantidad de radioactividad inicialmente contenida dentro de las mitocondrias se tomó una alícuota de 0.5 ml. de la mezcla de incubación sin añadirle el adenín nucleótido frío y se agregó a un tubo que contenía atractilósido, posteriormente se procedió de la misma manera que con

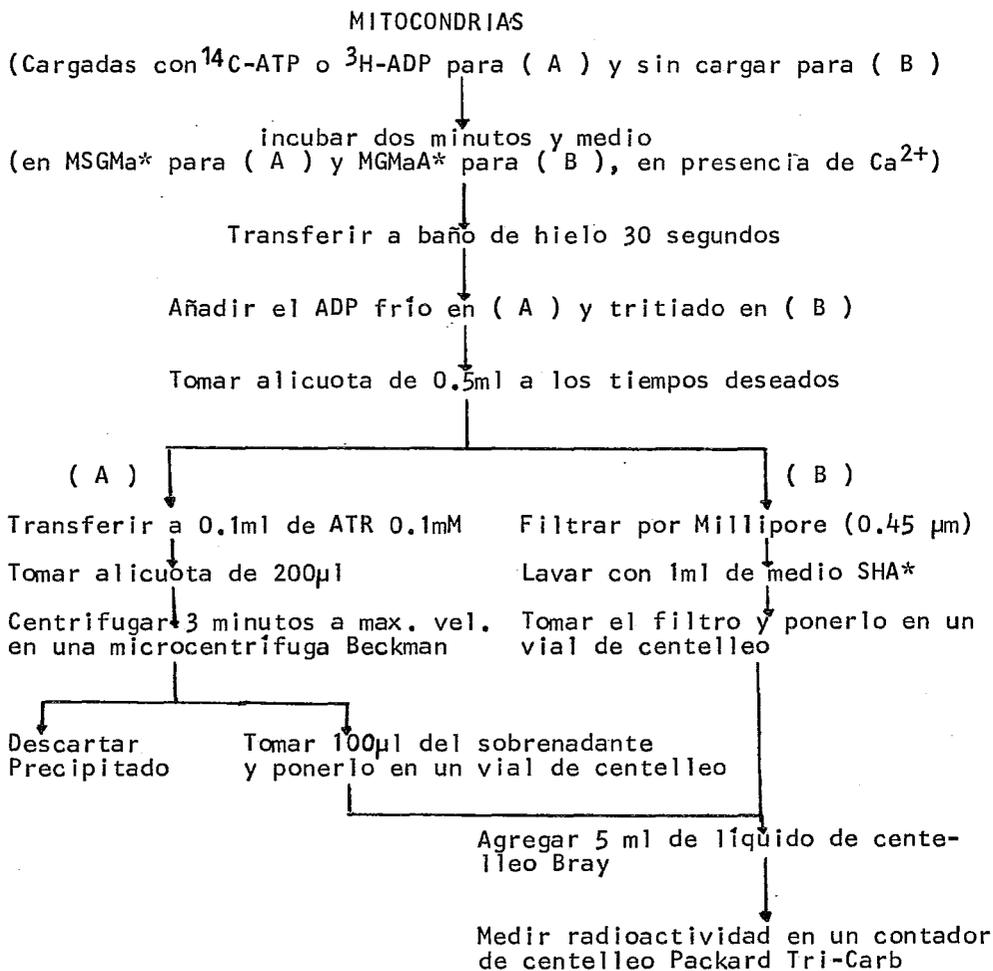


FIGURA E. ESQUEMA DE LOS METODOS DE A) PARO POR INHIBIDOR Y B) FILTRACION POR MILLIPORE

*Ver abreviaturas

los tubos anteriores.

- b) Método de filtración a través de filtros Millipore
- Las mitocondrias (1.5 mg de proteína) fueron incubadas a temperatura ambiente durante dos minutos y medio en 2 ml de un medio que contenía 0.5 M manitol, 0.01 M glutamato de sodio, 0.01 M malato de sodio y 1 mg de albúmina, se agregó 50 μ M de CaCl_2 a los tubos que se señala en los resultados, después de este tiempo se transfirieron a un baño de hielo durante 30 segundos, posteriormente se añadió el ^3H -ADP para iniciar la captación. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de 0.5 ml. y se filtraron a través de filtros Millipore de 0.45 μ m de diámetro de poro. Una vez filtrada la alícuota, se lavan las mitocondrias del filtro con 1 ml. de medio SHA*. Los filtros secos se transfirieron a vial que contenía 5 ml. de líquido de centelleo Bray y se midió la radioactividad en un contador de centelleo Packard Tri-Carb. Ver figura E (pág. 39).

Las determinaciones de proteína se hicieron siguiendo el método de Biuret (35).

Todos los reactivos utilizados para la realización de los experimentos fueron de calidad reactivo analítico.

* Ver abreviaturas

R E S U L T A D O S

EFFECTO DEL CALCIO EN EL INTERCAMBIO DE ADENIN NUCLEOTIDOS A TRAVES DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para observar el efecto del calcio en el transporte de adenín nucleótidos a través de la membrana mitocondrial se utilizaron dos condiciones:

- a) Intercambio de ^{14}C -ATP interno por ADP externo.
Se utilizaron mitocondrias previamente cargadas con ^{14}C -ATP (como se describió en material y métodos), en presencia de más o menos 250 μM de CaCl_2 . La reacción se inició con ADP. La figura F (pág. 42) ilustra los resultados de este experimento en los cuales se observa una inhibición de la actividad de la translocasa medida como % de recambio de ^{14}C -ATP por ADP externo, en presencia de Ca^{2+} . La inhibición se establece desde los primeros 20 segundos de la incubación.
- b) Intercambio de ^3H -ADP interno por ADP externo.
Se procedió como en el experimento anterior y se utilizó una concentración de calcio de 100 μM . Los resultados se pueden observar en la figura G (pág. 44), donde también hay una inhibición en la actividad de la translocasa aunque en menor proporción ya que el recambio del ATP interno por ADP externo

FIGURA F. INTERCAMBIO DE ^{14}C -ATP interno por ADP externo

Mitocondrias conteniendo ^{14}C -ATP (8 mg de proteína) fueron -- añadidos a 4.0 ml. de una mezcla de incubación que contenía - en:

(●) 0.25 M de manitol más 0.07 M de sacarosa ajustada a pH 7.4 con tris-base; 0.01 M de las sales de sodio de glutamato y malato ajustados a pH 7.4 y en:

(○) la mezcla anterior adicionada con 250 μM de CaCl_2

Al final de un período de 2:30 minutos a temperatura ambiente la mezcla de incubación fue transferida a un baño de hielo; - 30 segundos después 0.4 mM de ADP fue añadido. La reacción - fue detenida en los tiempos indicados en la Figura por la adición de alícuotas de 0.5 ml. a 100 μM de atractilósido.

EFFECTO DEL CALCIO EN EL INTERCAMBIO DE ^{14}C -ATP INTERNO POR
ADP EXTERNO

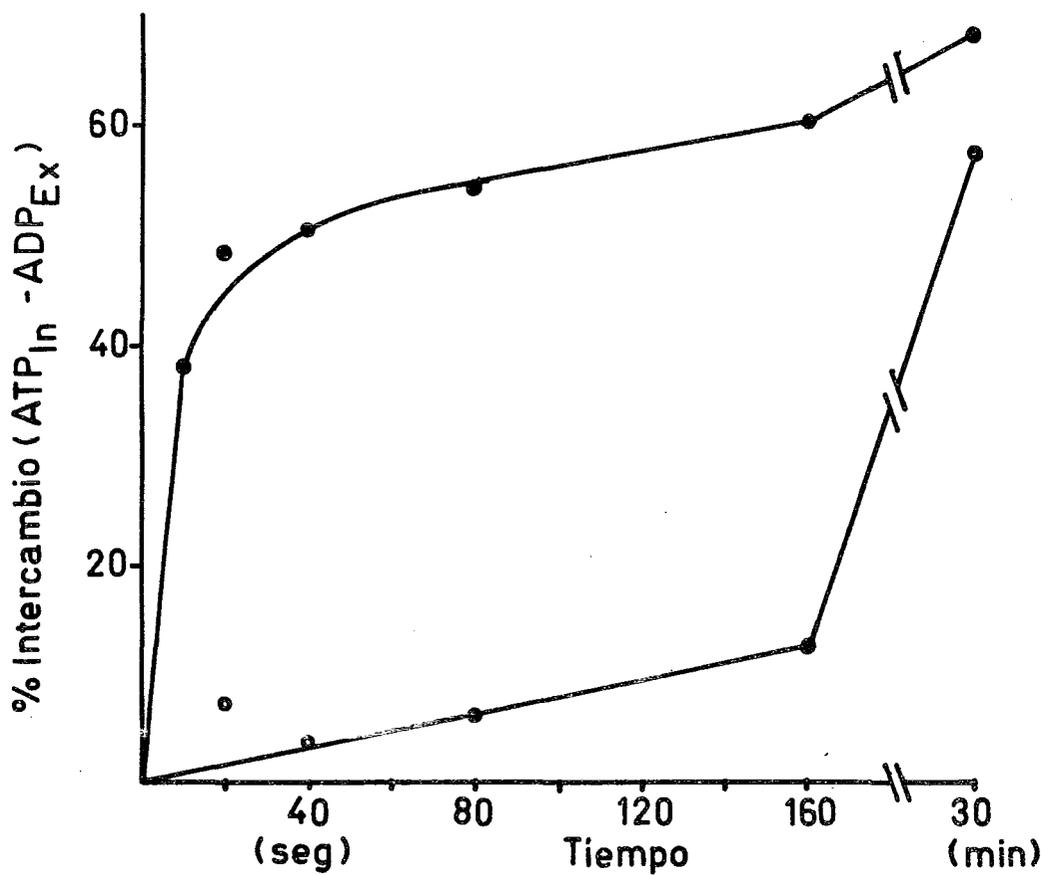


Figura F

- Control
- + Ca²⁺ (250 μM)

EFFECTO DEL CALCIO EN EL INTERCAMBIO DE ^3H -ADP INTERNO POR ADP EXTERNO

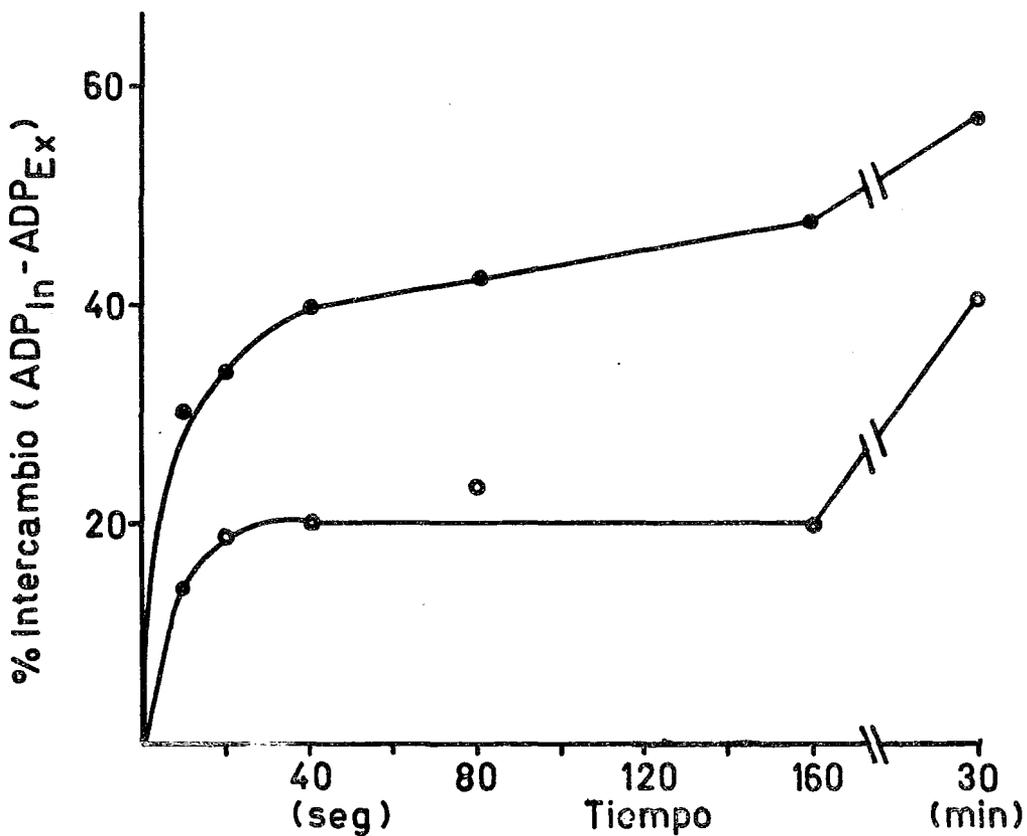


Figura G

- Control
- + Ca²⁺ (100 μM)

FIGURA G. INTERCAMBIO DE ^3H -ADP INTERNO POR ADP EXTERNO
Las condiciones experimentales fueron similares a las utilizadas para el experimento de la figura F, excepto que las mitocondrias contenían ^3H -ADP y la concentración de calcio empleada que fue de 100 μM.

se inhibe 94% y el ADP interno por ADP externo se inhibe un 50% a los 40 segundos de iniciada la --- reacción. Además se observó que no existe un equi-
librio de los adenín nucleótidos marcados en las -
mitocondrias en las condiciones empleadas, ya que
el porcentaje total de nucleótidos intercambiado -
es diferente en ambos casos, siendo menor en el ca-
so del recambio ADP-ADP que en el de ATP-ADP.

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO EN EL INTERCAM- BIO DE ADENIN NUCLEOTIDOS

La figura H (pág. 46), muestra los resultados de dis-
tintas concentraciones de calcio en el recambio de ^3H -ADP in-
terno por ADP externo medidos por el método de "paro por inhi-
bidor". Se observa que la inhibición de la actividad de la -
translocasa es proporcional a la concentración de calcio aña-
dido al medio de incubación y que la inhibición media máxima
se obtuvo con 40 nmoles de calcio añadido por mg de proteína.

EFFECTO DEL CALCIO Y ROJO DE RUTENIO EN EL INTERCAMBIO DE ADE- NIN NUCLEOTIDOS

En el experimento ilustrado en la figura I (pág. 47),
se probó el efecto del rojo de rutenio a una concentración --
(12.5 μM) que bloquea el transporte de calcio (16, 17).

En las condiciones experimentales utilizadas, el cal--
cio añadido al sistema, es captado por la mitocondria casi en

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO EN EL INTERCAMBIO DE ADENIN NUCLEOTIDOS

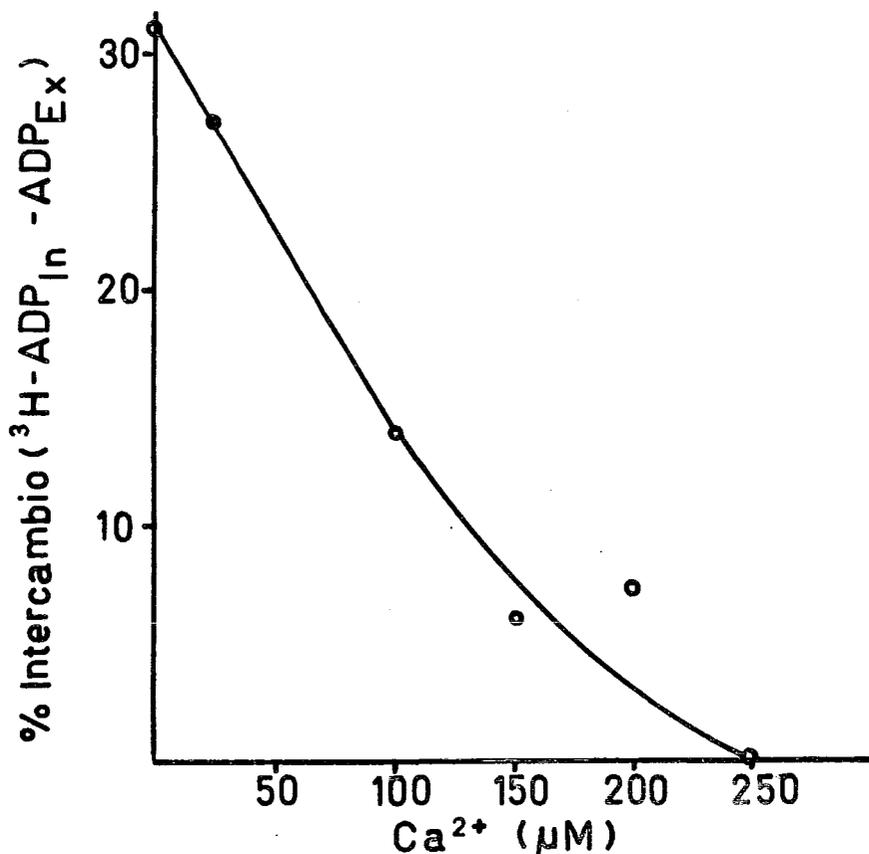


FIGURA H. INTERCAMBIO DE ³H-ADP INTERNO POR ADP EXTERNO

Las condiciones experimentales fueron similares a las utilizadas para el experimento de la Figura G, excepto porque el medio de incubación contenía las concentraciones de calcio que se indican en la gráfica y el muestreo se realizó 10 segundos después de la adición del ADP.

EFFECTO DEL CALCIO Y ROJO DE RUTENIO EN EL INTERCAMBIO DE ADENIN NUCLEOTIDOS

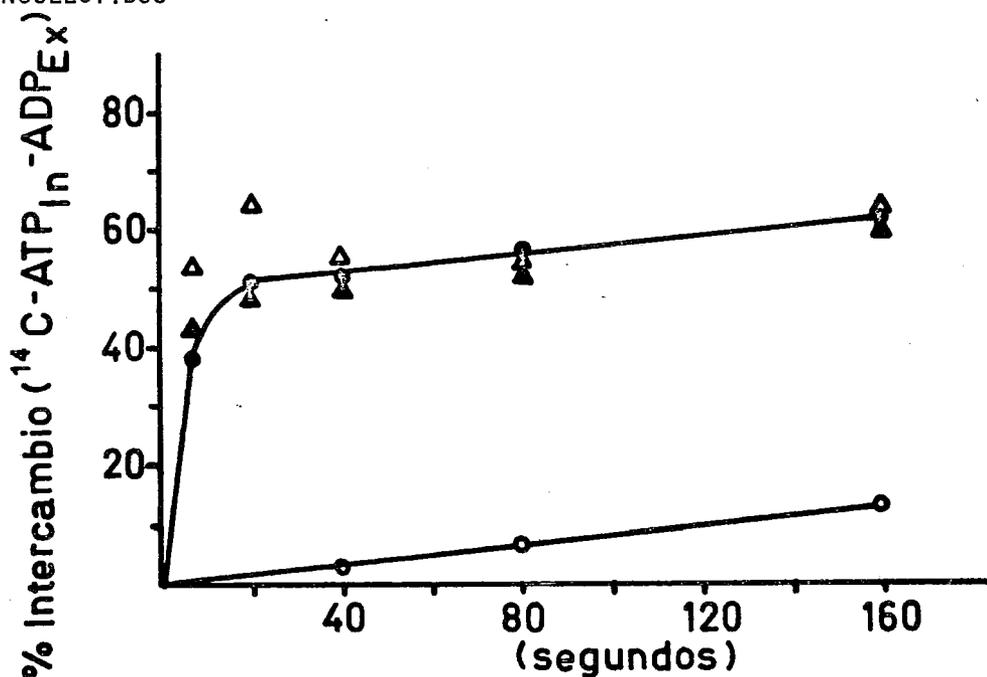


Figura 1

- Control
- +Ca²⁺
- ▲ +RR+Ca²⁺
- △ +RR

FIGURA 1. INTERCAMBIO DE ¹⁴C-ATP INTERNO POR ADP EXTERNO

Las condiciones experimentales fueron similares a las de la Figura F. Los medios de incubación contenían: (●) control; (○) 250 μM de CaCl₂; (▲) 12.5 μM de rojo de rutenio; y (△) 12.5 μM de rojo de rutenio + 250 μM de CaCl₂.

su totalidad en ausencia de rojo de rutenio y en un porcentaje muy bajo en su presencia, el experimento muestra que el calcio solo ejerce una acción inhibitoria cuando se le permite que penetre al interior de la mitocondria, lo cual se observa en la figura I (pág. 47), en la cual cuando se expusieron las mitocondrias al rojo de rutenio y calcio, el rojo de rutenio impidió que éste fuera transportado y por lo tanto no ejerció ningún efecto inhibitor en la actividad de la adenín nucleótido translocasa.

En algunos experimentos el rojo de rutenio indujo un pequeño aumento en la velocidad de intercambio de los adenín nucleótidos.

EFFECTO DEL CALCIO EXTERNO E INTERNO EN EL INTERCAMBIO DE ADENIN NUCLEOTIDOS EN MITOCONDRIAS

En este experimento las mitocondrias se colocaron en dos condiciones distintas: en ausencia y en presencia de substratos (0.01 M de glutamato de sodio y 0.01 M de malato de sodio).

Se puede observar en la figura J (pág. 49), que el calcio en presencia de ambos substratos inhibe la actividad de la translocasa alrededor del 50%, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos en presencia de calcio y rojo de rutenio ya que los substratos respiratorios inducen la acumulación de calcio y por lo tanto este puede penetrar en la mito-

EFFECTO DEL CALCIO EN PRESENCIA DE SUBSTRATOS RESPIRATORIOS

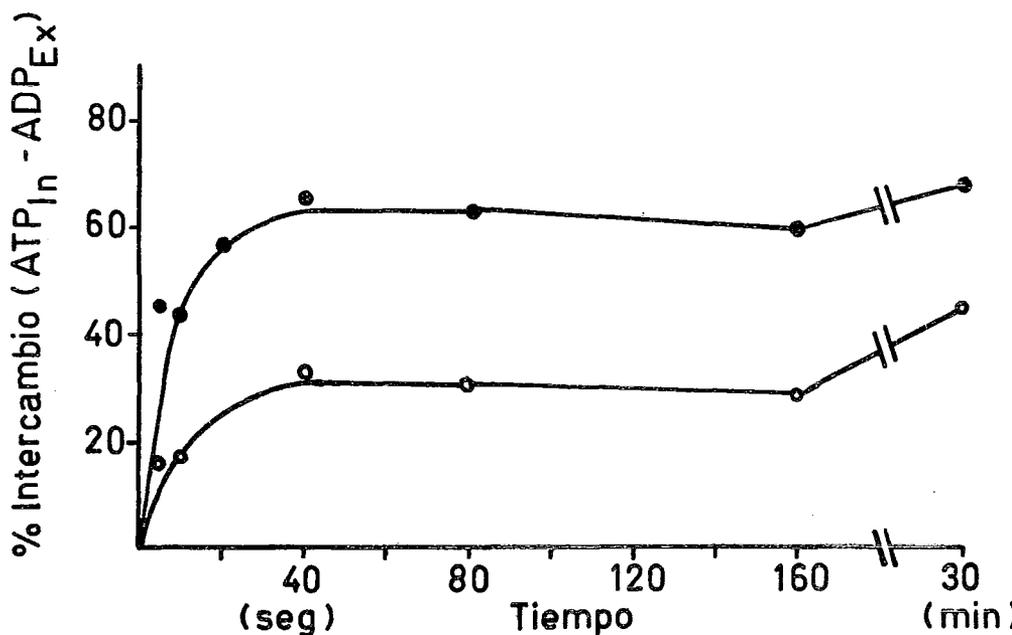


Figura J

● Control
○ +Ca²⁺ (250 μM)

FIGURA J. INTERCAMBIO DE ¹⁴C-ATP INTERNO - ADP EXTERNO

Las condiciones experimentales fueron como en la Figura F., excepto que el experimento se llevó a cabo en presencia de: 0.01M de malato-Na y 0.01 M de glutamato-Na (●); y la mezcla anterior adicionada de 250 μM de CaCl₂ (○).

condria y ejercer su efecto inhibitor en la adenín nucleótido translocasa.

La figura K (pág. 51), ilustra el efecto del calcio -- añadido en el medio de incubación en ausencia de substratos, situación en la cual la acumulación del mismo no se lleva a -- cabo y por lo tanto en estas condiciones el calcio no tiene -- su acción inhibitoria, se observa una ligera estimulación de la actividad de intercambio.

EFFECTO DE LA ROTENONA, ANTIMICINA A, OLIGOMICINA Y 2,4-DINI-- TROFENOL EN LA INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENIN NUCLEO TIDO TRANSLOCASA PRODUCIDA POR CALCIO

La Tabla I muestra el efecto del calcio en la adenín - nucleótido translocasa incubando las mitocondrias bajo varias condiciones experimentales (detalladas en la tabla).

Se puede observar que la antimicina A, un inhibidor -- del transporte de electrones y el 2,4-dinitrofenol, un desaco plante, revierten el efecto inhibitorio producido por el calcio en la adenín nucleótido translocasa ya que no permiten -- que este penetre a la mitocondria, por lo tanto, en estas con diciones al igual que con el rojo de rutenio, no existe inhi bición del calcio ya que éste ejerce su efecto estando en el interior de la mitocondria. El 2,4-dinitrofenol por sí mismo presenta efecto inhibitorio sobre la actividad de la translo- casa. En presencia de oligomicina si se observa el efecto in

EFFECTO DEL CALCIO EN AUSENCIA DE SUBSTRATOS RESPIRATORIOS

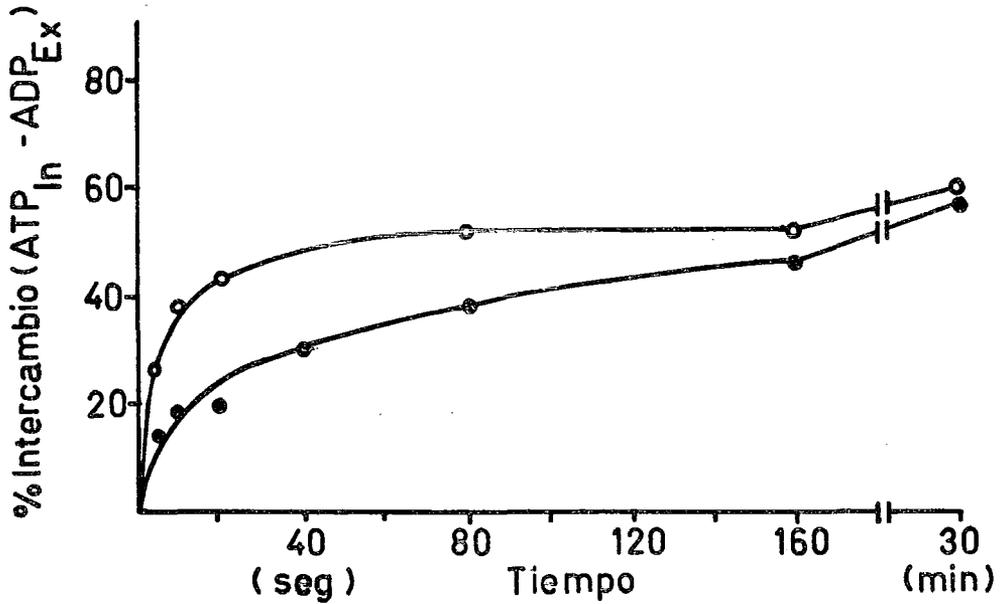


Figura K

○ Control
● +Ca²⁺ (250 μM)

FIGURA K. INTERCAMBIO DE ¹⁴C-ATP EXTERNO POR ADP INTERNO

Las condiciones experimentales están descritas en la Figura F, con excepción de que los experimentos se hicieron en ausencia de sustratos (●) y con 250 μM de CaCl₂ (○).

TABLA I

EFFECTO DE LA ROTENONA, ANTIMICINA A, OLIGOMICINA Y 2,4-DINITROFENOL EN LA INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENIN NUCLEOTIDO TRANSLOCASA PRODUCIDA POR CALCIO.

adiciones	% adenín nucleótidos intercambiados	
	-Ca ²⁺	+Ca ²⁺
-	59	38
Rotenona	61	55
Antimicina A	57	50
Oligomicina	54	39
2,4-dinitrofenol	42	42

Tabla I. INTERCAMBIO DE ¹⁴C-ATP INTERNO POR ADP EXTERNO

El intercambio se llevó a cabo en 20 segundos y se midió de la misma manera que en la figura F. Las concentraciones de las sustancias añadidas como se indica en la tabla son las siguientes: 100 µM de Calcio, 10 µg de rotenona, 0.1 µM antimicina A, 10 µg de oligomicina y 0.1 mM de 2,4-dinitrofenol.

inhibitorio del Ca^{2+} sobre la translocasa, ya que en estas condiciones, existe transporte de electrones que permite la entrada de calcio dentro de la mitocondria.

En todos los experimentos anteriores a estos, el recambio se llevó a cabo en ausencia de inhibidores de la ATPasa, sin embargo, como se puede observar aún en presencia de compuestos como la oligomicina capaces de bloquear la ruptura de ATP durante la captación de calcio, éste inhibe la actividad de la translocasa. La velocidad del rompimiento espontáneo de adenín nucleótidos radioactivos no es afectada en forma importante por el calcio, lo cual sugiere que las mitocondrias no se están dañando durante el proceso. Estos resultados se pueden observar en la Tabla I.

EFFECTO DEL CALCIO EN LA ENTRADA DE ^3H -ADP A LA MITOCONDRIA

En los experimentos de la Tabla II se utilizó el método de filtración por Millipore (descrito en material y métodos). En este experimento se puede observar que el efecto inhibitor del calcio no es una consecuencia de que éste actúe atrapando a los adenín nucleótidos en el interior de la mitocondria, ya que si este fuera el caso, lo que se esperaría es que la entrada de adenín nucleótidos marcados no se alterara por el calcio o incluso pudiera ser estimulada, debido a una captación neta de adenín nucleótidos. La Tabla II muestra claramente que en presencia del calcio disminuye la cantidad

TABLA II

EFEECTO DEL CALCIO EN LA ENTRADA DE $^3\text{H-ADP}$ A LA MITOCONDRIA

Tiempo de incubación (segundos)	NMOLES DE $^3\text{H-ADP}$ CAPTADO POR MILIGRAMO DE PROTEINA MITOCONDRIAL	
	$-\text{Ca}^{2+}$	$+\text{Ca}^{2+}$
40	2.1	1.2
80	2.7	1.6
160	4.1	2.2

TABLA II. INTERCAMBIO DE ATP INTERNO POR $^3\text{H-ADP}$ EXTERNO

Las mitocondrias (1.5 mg proteína) se incubaron durante 2.5 min. a temperatura ambiente en 2.0 ml de una mezcla que contenía 0.5 M de manitol, 0.01 M de glutamato-Na, 0.01 M de malato-Na, 1 mg de BSA y 50 μM de CaCl_2 en los experimentos donde se probaba el efecto del calcio. Después de pasarlas a un baño de hielo durante 30 segundos se añadieron 20 nmolas de $^3\text{H-ADP}$. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados en la gráfica y se filtraron a través de filtros Millipore de 0.45 μM de diámetro de poro. El filtro se lavó, con 1ml de medio de aislamiento de las mitocondrias y se determinó la radioactividad.

de ^3H -ADP que penetra en las mitocondrias.

EFFECTO DEL CALCIO EN EL INTERCAMBIO DE ^{14}C -ATP INTERNO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ADP EXTERNO

El experimento de la figura L (pág. 56), se llevó a cabo utilizando el método de paro por inhibidor. Este experimento nos ilustra un poco más acerca del mecanismo a través del cual el calcio acumulado por las mitocondrias disminuye la actividad de la adenín nucleótido translocasa, ya que se midió el intercambio de ^{14}C -ATP interno por ADP externo a diferentes concentraciones.

Los resultados muestran que aún a concentraciones en las cuales el ADP externo es el que limita la velocidad de intercambio, el calcio sigue disminuyendo la actividad de la adenín nucleótido translocasa, de aquí que exista la posibilidad de que el calcio interno pueda estar quelando a los adenín nucleótidos internos y de esta forma disminuir su concentración dentro de la mitocondria, lo cual limitaría la velocidad de intercambio.

Ya que Klingenberg (24) ha demostrado que un incremento en el AMP mitocondrial reduce la velocidad del intercambio podría suponerse que el calcio induciría un incremento del porcentaje de adenín nucleótidos presentes dentro de la mitocondria como AMP. Se han hecho medidas directas de la concentración de AMP dentro de las mitocondrias de hígado de rata -

EFFECTO DEL CALCIO EN EL INTERCAMBIO DE ^{14}C -ATP INTERNO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ADP EXTERNO

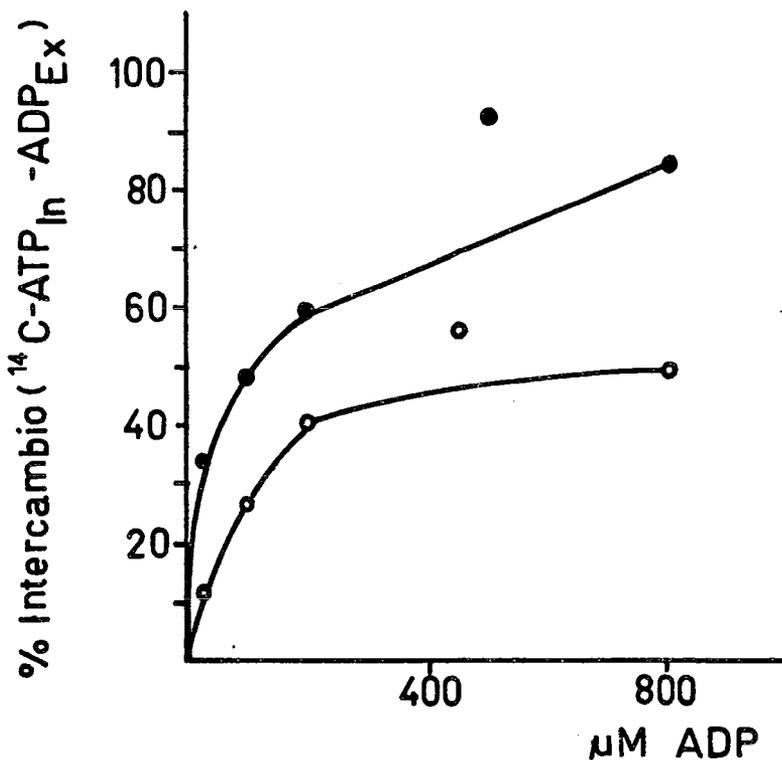


Figura L

● Control
○ + Ca²⁺ (100 µM)

FIGURA L. INTERCAMBIO DE ^{14}C -ATP INTERNO POR ADP EXTERNO

El experimento se llevó a cabo como en la figura F., excepto porque las muestras se tomaron 20 segundos después de la adición de ADP y la concentración de calcio fue de 100 µM.

incubadas con glutamato y malato, que han demostrado que en estas condiciones alrededor del 33% del contenido total de adenín nucleótidos está como AMP antes de la acumulación de 50 nmoles de calcio por miligramo de proteína y 49% después de la acumulación del calcio.

D I S C U S I O N

Ha sido reportado en los trabajos de Spencer y Bygrave (31, 32) que concentraciones bajas del ión calcio añadidas a - mitocondrias de hígado de rata estimulan el intercambio de ATP.

En este trabajo, se presentan datos que aparentemente no concuerdan con estos resultados debido a que en nuestros ex perimentos encontramos una inhibición de la adenín nucleótido translocasa producida por calcio, sin embargo, ambos casos pue den ser compatibles dependiendo del sitio de acción del calcio. Las condiciones experimentales de Spencer y Bygrave (32) difie ren con respecto a las presentadas en este trabajo en cuanto - al posible sitio de acción del calcio. En los experimentos de Spencer y Bygrave el calcio y los adenín nucleótidos se añaden al mismo tiempo en el medio que contiene las mitocondrias incu badas a 4° C, en este caso creemos nosotros que el calcio no se está acumulando en la mitocondria, sino que lo que probablemen te se acumula es ATP ya que las mitocondrias están respondiend o a un efecto del calcio externo, pudiéndose observar un efeg to estimulatorio ya sea por la fijación del calcio a los fosfo lípidos, o a algunas otras estructuras membranales que se en-- cuentren alrededor de la translocasa de los adenín nucleótidos formando de esta manera una carga membranal que permita que el ATP se intercambie más rápidamente.

Por el contrario, en nuestras condiciones experimenta--

les se permite que el calcio se acumule antes de iniciar la --
reacción de intercambio y debido a esto, es posible suponer --
que el efecto inhibitor observado sea debido al calcio interno.
En el experimento ilustrado en la figura K, se encuentra un --
efecto estimulante en presencia de calcio en condiciones en --
las que no se ha permitido que éste penetre por ausencia de --
substrato y que estaría de acuerdo con lo observado por Spencer
y Bygrave.

Los resultados parecen mostrar claramente que en todas
las ocasiones en las que al calcio no se le permitió penetrar
en la mitocondria antes de iniciar el intercambio se previno -
la acción inhibitoria del mismo, es decir en presencia del ro-
jo de rutenio, antimicina A ó 2,4-dinitrofenol, los cuales in-
hiben la captación del calcio mediante distintos mecanismos. -
Estos datos nos llevan a la conclusión de que la acción inhibi-
toria del calcio es ocasionada por el calcio que se encuentra
en el interior de la mitocondria.

Apoyando esta conclusión Duszyński et. al. (36) encon-
traron una estimulación de la actividad de la translocasa en -
presencia del ionóforo A23187, los autores aducen que el efec-
to es ocasionado por la entrada del magnesio, pero también es
muy probable que la pérdida de calcio de la mitocondria sea la
responsable de la activación observada por los autores anterio-
res.

Thorne y Bygrave (37) en un trabajo para investigar los efectos del calcio en reacciones dependientes de energía en células Ehrlich de tumor de ascitis, observaron que niveles bastante bajos de calcio previenen la respuesta respiratoria normal al ADP; ellos proponen que esta respuesta pudiera estar relacionada con una interacción del calcio con el sistema de la adenín nucleótido translocasa; sin embargo, no especifican si este efecto es ocasionado por el calcio externo o interno, pero sus resultados están de acuerdo con los presentados en este trabajo.

La disminución de la actividad de intercambio en presencia de un exceso de calcio interno podría explicarse por la -- formación de un complejo del calcio con el ADP o ATP y también podría ser ocasionada por la presencia de un mayor porcentaje de adenín nucleótidos presentes como AMP bajo estas condiciones ya que el porcentaje de AMP interno se incrementa un poco (de 33% a 49%) en mitocondrias de hígado de rata después de la captación de calcio.

Por todos los antecedentes presentados y los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible pensar que el calcio es un agente que podría actuar como un regulador importante de la translocación de adenín nucleótidos al interior de la mitocondria.

A B R E V I A T U R A S

ADP	Difosfato de Adenosina
AMP	Monofosfato de Adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATPasa	Adenosín Trifosfatasa
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca ²⁺	Calcio
Ci	Curie
μCi	Microcurie
cpm	cuentas por minuto
DCCD	N,N'-d ciclohexil carbodiimida
DNP	2,4-dinitrofenol
FCCP	Carbonil cianuro p-trifluorometoxifenil hidrazona
HEPES	Acido (N-2-hidroxil-piracina) N-2 etano sulfónico
MGMaA	0.5M Manitol, 0.01M Glutamato de Sodio, 0.01M Malato de Sodio, 1 mg Albúmina
MSGMa	0.25M Manitol, 0.70M Sacarosa, 0.01M Glutamato de Sodio, 0.01M Malato de Sodio
OSCP	Proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina
RR	Rojo de Rutenio
SHA	Sacarosa 0.25 M, HEPES 2 mM, BSA 0.1% pH 7.4

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Tribe, M. y Whittaker, P. Cuadernos de Biología. Cloroplastos y Mitocondrios. Ediciones Omega, S.A. Barcelona (1977).
- 2.- Singer, S.J. The Molecular Organization of Biological Membranes. Molecular Biology. Structure and Function of Biological Membranes. Lawrence I. Rothfield Ed. Academic Press. - New York (1971).
- 3.- Davson, H., and Danielli, J.F., The Permeability of Natural - Membranes. 2nd Ed. Cambridge Univ. Press. London and New - York (1952).
- 4.- Kotyk, A. Membranes and Transport. Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. 12 [2] 135-140 (1977).
- 5.- Bioquímica. Lehninger, A.L. 2^a Ed. Ediciones Omega S.A. Casa nova 220 - Barcelona 11, septiembre (1978).
- 6.- Green, D. La Mitocondria. La Célula Viva. Selecciones del - Scientific American. 105-113. 2^a Ed. Editorial Blume. España (1970).
- *7.- Racker, E. La Membrana de la Mitocondria. La Célula Viva. Se - lecciones del Scientific American. 150-158. 2^a Ed. Editorial Blume. España (1970).

- 8.- Mitchell,P., Tager,G.M., Papa,S., Quagliariello,E. and Slater,E.C. (Editores). Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria. Vol. 7, pag. 65, (1966).
- 9.- DePierre,J.W. and Ernster,L. Enzyme Topology of Intracellular Membranes. Ann. Rev. Biochem. 46, 201-262 (1977).
- 10.- Slater,E.C. Mechanism of Oxidative Phosphorylation. Ann. - Rev. Biochem. 46, 1015- 1026 (1977).
- 11.- Pedersen,P.L. Bioenergetics for Graduate Students. John Hopkins School of Medicine (1974).
- 12.- Gómez Puyou,A. and Gómez Lojero,C. The Use of Ionophores and Chanell formers in the Study of the Function of Biological Membranes. Current Topics in Bioenergetics. Academic - Press Inc. D. Rao Sanadi Editor. New York. 6, 221-256 (1977)
- 13.- Mitchell,P. Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. Glynn Research Ltd. Bodwin Cornwell. 1-192 (1966).
- 14.- Boyer,P.D. Coupling Mechanisms in Capture, Transmission and Use of Energy. Ann. Rev. Biochem. 46, 957-966 (1977).
- 15.- Klingenberg,M. Metabolite Transport in Mitochondria: An Ex-

ample for Intracellular Membrane Function, Essays of Biochemistry. 6, 119-159 (1970).

16.- Vasington, F.D., Gazzotti, P., Tiozzo, R. and Carafoli, E. The Effect of Ruthenium Red on Ca^{2+} Transport and Respiration in Rat Liver Mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 256, 43-54 (1972).

17.- Moore, C.L. Specific Inhibition of Mitochondrial Ca^{2+} Transport by Ruthenium Red. Biochem. Biophys. Res. Com. 42 [2] 298-305 (1971).

18.- Mela, L. Interaction of La^{3+} and Local Anesthetic Drugs with Mitochondrial Ca^{2+} and Mn^{2+} Uptake. Arch. Biochem. Biophys. 123, 286-293 (1968).

19.- Lehninger, A.L. Mitochondria and Calcium Ion Transport. Biochem. J. 119, 129-138 (1970).

20.- Vercesi, A., Reynafarje, B. and Lehninger, A.L. Stoichiometry of H^+ Ejection and Ca^{2+} Uptake Coupled to Electron Transport in Rat Heart Mitochondria. J. Biol. Chem. 253, [18] - 6379-6385 (1978).

21.- Bruni, A., Luciani, S. and Contessa, A.R. Inhibition by Atrac

tyloside of the Binding of Adenine-Nucleotides to Rat-Liver Mitochondria. Nature. 201, 1219-1220 (1964).

- 22.- Vignais, P.V. and Dueé, E.D. Translocation et Compartimentation des Adénine-Nucléotides dans les Mitochondries. Bull. Soc. Chim. Biol. 48, 1169-1187 (1966).
- 23.- Dueé, E.D. and Vignais, P.V. Kinetics and Specificity of the Adenine Nucleotide Translocation in Rat Liver Mitochondria. J. Biol. Chem. 244 [14] 3920-3931 (1969).
- 24.- Pfaff, E. and Klingenberg, M. Adenine Nucleotide Translocation of Mitochondria. 1. Specificity and Control. Eur. J. Biochem. 6, 66-79 (1968).
- 25.- Vignais, P.V. Molecular and Physiological Aspects of Adenine Nucleotide Transport in Mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 456, 1-38 (1976).
- 26.- Chávez, E., Klapp, M. y Janovitz, A. Características del Transporte de ADP y ATP en Mitochondrias. Temas Bioquímicos de Actualidad. Universidad Nacional Autónoma de México. 1^a Ed. 161-175 (1978).
- 27.- Chávez, E. and Klapp, M. A New Inhibitor of Adenine Nucleotide Translocase in Mitochondria: Agaric Acid. Biochem. Bio-

- 2254-2261 (1965).
- 34.- Schneider,W.C. and Hogeboom,G.H. Intracellular Distribution of Enzymes. V. Further Studies on the Distribution of Cytochrome c in Rat Liver Homogenates. J. Biol. Chem. 183, 123-128 (1950).
- 35.- Gornall,A.G., Bardawill,C.J. and David,M.M. Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. J. Biol. Chem. 177, 751-766 (1949).
- 36.- Duszyński,J., Savina,M.V., and Wojtczak,L. Effect of the Divalent Cation Ionophore A23187 on the Translocation of Adenine Nucleotides in Liver Mitochondria. FEBS Letters. 41 [1] 118-121 (1974).
- 37.- Thorne,R.F.W. and Bygrave,F.L. Inhibition by Calcium of Adenine Nucleotide Translocation in Mitochondria Isolated from Ehrlich Ascites Tumour Cells. FEBS Letters. 41 [1] 118-121 (1974).