



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales**

**" I Z T A C A L A "**

**ACCION DEL  $\text{Ca}^{2+}$  EN MITOCONDRIAS  
DE PLACENTA HUMANA**

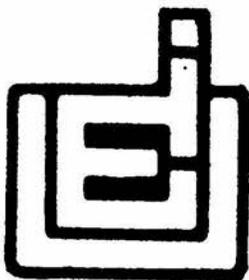
**T E S I S**

Que para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P r e s e n t a :

**J. PEDRO GARDUÑO RUIZ**



Tlalnepantla, Edo. de Méx.

1990



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.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr Federico Martínez Montes Director de este proyecto, su confianza, su valiosa asesoría y apoyo durante el desarrollo del mismo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.

Al Dr. Vicente Díaz Sánchez, al Dr. Federico Fernández Gabarrón y a la Q.F.B. Ma. Teresa Espinoza García, por su valiosa aportación a este trabajo.

Al Dr. Juan C. Díaz Zagoya, al Dr. Juan Pablo Pardo y al M. en C. Juan Luis Rendón, por su apoyo y sugerencias.

Al M. en C. Sergio Gonzalez Moreno, al M. en C. Hector Barrera Escorcía, Al M. C. José Trinidad Suarez Rocha y al Biol. Martín Palomar Morales, por la revisión del manuscrito, sus consejos y sugerencias.

ACCION DEL  $\text{Ca}^{2+}$  EN MITOCONDRIAS DE PLACENTA HUMANA

Lista de abreviaturas.....	4
I. Resumen.....	5
II. Introducción.	
1. Importancia del $\text{Ca}^{2+}$ en los sistemas biológicos.....	7
2. Transporte en membranas.....	7
3. Efecto del $\text{Ca}^{2+}$ sobre la respiración y fosforilación oxidativa.....	10
4. Efecto del $\text{Ca}^{2+}$ sobre la síntesis de hormonas esteroides.....	10
5. Estudios iniciales en la placenta humana.....	13
6. Cadenas de transporte de electrones en la placenta humana.....	14
7. Características generales de la placenta humana a término.....	17
III. Objetivos.....	19

IV. Material y Métodos.	
1. Aislamiento de las mitocondrias.....	20
2. Determinación de proteínas.....	21
3. Medición del consumo de oxígeno.....	23
4. Determinación colorimétrica del calcio total mitocondrial.....	23
5. Amortiguador $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA.....	24
6. Extracción en éter y determinación de P4.....	25
7. Determinación de la actividad de ATPasa y Pi.....	26
8. Determinación espectrofotométrica sobre 5 segmentos de la cadena de transporte de electrones.....	28
9. Preparación de las PSM.....	30
V. Resultados.	
Efecto del $\text{Ca}^{2+}$ sobre:	
La respiración.....	32
La biosíntesis de P4.....	35
La cadena de transporte de electrones.....	39
La actividad de ATPasa.....	44
VI. Discusión.....	49
VII. Conclusiones.....	53
VIII. Referencias.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato de adenosina 3',5'-cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca <sup>2+</sup>	Calcio libre extramitocondrial
CEM	Coefficiente de extinción molar
DCPIP	Diclorofenolindofenol
DNP	Dinitrofenol
EDTA	Etilendinitrilotetracetato ( Disódico)
EGTA	Etilenglicol-bis-(β-aminoetil eter)-N,N,N',N'- tetracetato
FAD	Flavin adenin dinucleótido
MOPS	Acido morfolinopropanosulfónico
MPH	Mitocondrias de placenta humana
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenin dinucleótido (oxidado)
NADP <sup>+</sup>	Fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido (oxidado)
P4	Progesterona
Pi	Fosfato inorgánico
pm	Proteína mitocondrial
PMS	Fenasinametasulfato
PSM	Partículas submitocondriales
TCA	Acido tricloroacético
TMPD	Tetrametilenparafenilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano

## RESUMEN

En el presente trabajo, se investigó el efecto del calcio libre extramitocondrial ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sobre los procesos de la respiración y biosíntesis de progesterona (P4), así como el posible sitio de actividad en las mitocondrias de placenta humana (MPH) a término.

Los resultados nos indicaron que en las MPH incubadas con concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$  calculadas (26), desde 1 nM hasta 5.0  $\mu\text{M}$ , hubo una inhibición del 70 % en la velocidad de respiración en el intervalo 0.1 a 5.0  $\mu\text{M}$ , así como una reducción del 30% en el consumo de oxígeno en el intervalo 1 a 100 nM al ser adicionado al medio de respiración 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ .

Por otro lado, en las mismas condiciones de respiración en ausencia del  $\text{Mg}^{2+}$ , se observó un incremento transitorio en la síntesis de P4 al aproximarse a 500 nM la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que en presencia del  $\text{Mg}^{2+}$  no se presentó tal actividad.

La cadena de transporte de electrones se fragmentó con el uso de inhibidores específicos para determinar el posible sitio de acción del  $\text{Ca}^{2+}$ . Los resultados nos mostraron que este ion produjo un incremento en la actividad de los segmentos que utilizan como aceptor final al citocromo c.

Por otro lado, la ATPasa mostró un incremento en su actividad al elevarse las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Nuestros hallazgos sugieren que en las MPH el  $\text{Ca}^{2+}$  reduce la respiración mitocondrial y que esto pudiera explicar el incremento transitorio en la síntesis de P4, además de sugerir que el  $\text{Ca}^{2+}$  actúa a otro nivel diferente a la cadena de transporte de electrones y la ATPasa, ya que estos procesos no se vieron inhibidos significativamente por la presencia del ion. Estos datos dan la pauta para un papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en el proceso respiratorio y en la biosíntesis de P4 en las MPH, además de abrir el camino a una futura intervención en los mecanismos involucrados en la modulación del  $\text{Ca}^{2+}$  y su participación en otros procesos de este tejido esteroideogénico.

## II. INTRODUCCION

1. Importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  en los sistemas biológicos. En los últimos años se ha aceptado que el  $\text{Ca}^{2+}$  es un ion con amplia distribución celular, que desempeña un papel importante en los procesos biológicos tan diversos como la contracción muscular, la división celular y la secreción hormonal. Además se encuentra entre los segundos mensajeros, para llevar la información química o eléctrica que llega a la membrana celular hasta los sitios donde se lleva a cabo el efecto, para conseguir así un control eficaz de los procesos involucrados. Hasta ahora, se ha llegado a identificar que su acción radica en la modulación de la actividad de varias enzimas, produciendo la regulación de algunas vías metabólicas.

Por otro lado, ha sido estudiado ampliamente el mecanismo por el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  es acumulado en la mitocondria (3), en donde la concentración libre de este catión en fluidos de mamíferos varía desde: 1 mM en plasma, de 0.1 a 1.0  $\mu\text{M}$  (intervalo fisiológico) en citosol, a 1.0  $\mu\text{M}$  en la matriz mitocondrial (7).

2. Transporte en membranas. Los trabajos llevados a cabo en las membranas de células y organelas subcelulares de múltiples tejidos animales, han permitido reconocer la existencia de una gran variedad de sistemas de transporte, que controlan el

movimiento de algunos iones y moléculas a través de ellas en una forma pasiva a favor de gradientes electroquímicos o por un transporte activo que requiere acoplarse a una fuente de energía. Así mismo, los estudios realizados en las membranas mitocondriales muestran que del total de la energía respiratoria, sólo una fracción es usada para fines distintos de la fosforilación oxidativa, como es el transporte de ciertos metabolitos (malato<sup>2-</sup>, citrato<sup>3-</sup>, aspartato<sup>-</sup>, ADP<sup>3-</sup>, piruvato<sup>-</sup>, etc.), pero no así para las mitocondrias que respiran activamente y que mantienen o acumulan cationes ( K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, etc. ), en donde se considera que el intercambio es dirigido por una bomba de protones, que sugiere que la energía necesaria no proviene de la fosforilación oxidativa, debido a que la captación de cationes no es inhibida por la oligomicina en presencia del desacoplante dinitrofenol (DNP), (27).

Por otro lado, el estudio del Ca<sup>2+</sup> en la mitocondria ha permitido identificar un sistema transportador del catión que exclusivamente lo incorpora y otro que continuamente lo libera desde la matriz al citosol, lograndose con esto, establecer un ciclo de transporte a través de la membrana (3,7,28) el cual parece ser un factor importante en la regulación de este catión libre que normalmente es muy bajo en el citosol. Además se sabe que cuando el potencial de membrana está en el intervalo fisiológico, los transportadores de incorporación y liberación operan unidireccionalmente para permitir el continuo recambio de Ca<sup>2+</sup> a través de la membrana interna y así proveer la base para una regulación cinética en la distribución del catión entre el

citosol y la matriz mitocondrial (28).

Otro trabajo (4), realizado en células donde la concentración iónica del  $\text{Ca}^{2+}$  está en el intervalo "normal" alrededor de 200 nM, reporta que es probable que la principal función del sistema transportador de incorporación y liberación pueda ser la regulación de las enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial, más bien que para la regulación del catión en el citosol, con la salvedad de que en las células que normalmente experimentan concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico excediendo el rango micromolar (células óseas), estarían expuestas a concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que serían posiblemente adecuadas para activar la ruta de incorporación a la mitocondria.

La ruta de incorporación fue evidenciada inicialmente en mitocondrias aisladas de una variedad de fuentes (40), y más recientemente (3) se cree que esta captación es facilitada por la energía del potencial de membrana que dirige el transporte activo del catión con una transferencia de carga de 1, posiblemente a través de un antiportador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ .

Diversos trabajos realizados hasta hoy, han identificado dos vías diferentes de liberación del catión en mamíferos: una dependiente y otra independiente de  $\text{Na}^+$ . Un flujo de salida mediado por un antiportador  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  en mitocondrias de corazón, músculo esquelético y cerebro fue descubierto por Carafoli y *Cols.* (3), y un mecanismo similar ha sido demostrado en tejido adiposo pardo (40). Lehninger y *Cols.* (18) observaron un flujo de salida mediado por un transportador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  en mitocondrias de hígado, que además se ve regulado por el estado redox de los

piridín-nucléotidos. Con esto, quedó establecido que la liberación no ocurre por el intercambio con un ion de carga opuesta.

3. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la respiración y fosforilación oxidativa. Johnston y Cols. (14) reportan en mitocondrias de hígado de rata, un estímulo en la respiración cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  fue incrementada de 103 a 820 nM (intervalo fisiológico), argumentando que se debió a la preparación de las mitocondrias con una cantidad de calcio endógena aproximada a 1 nmol/mg de proteína, similar a la que se encuentra in vivo (14), suponiéndose con estos resultados que el contenido de calcio endógeno afecta la respiración como anteriormente fue sugerido en otro trabajo (14).

Por otro lado, Moreno-Sánchez (26), reporta en un estudio realizado en mitocondrias de hígado de rata, que al manipular concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  calculadas (8) de 1 nM a 5  $\mu\text{M}$ , se ejerce un control aparente en los niveles de calcio intramitocondrial que subsecuentemente modulan la fosforilación oxidativa al verse afectado el traslocador de nucleótidos de adenina. También encontró que alrededor de 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  proporciona la máxima síntesis de ATP, pero esto puede variar con la presencia o ausencia del fosfato o  $\text{Mg}^{2+}$

4. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la síntesis de hormonas esteroides. La modulación en la síntesis fue estudiada inicialmente en homogenados de glándulas suprarrenales, en donde Stone y Hetcher (38), demostraron que la acción de la hormona adrenocorticotrópica

(corticotropina) era incrementar la conversión de colesterol a pregnenolona en la biosíntesis de corticoesteroides. Otros trabajos (17,31), mostraron que el efecto estimulador en la producción de corticosteroides, era ocasionado por mecanismos que involucraban: a) el congelamiento (cuyos efectos físicos eran inespecíficos) que incremento la síntesis hasta tres veces ; b) por la acción de la Ficina (una enzima proteolítica) que duplicó el efecto dado por la congelación; y c) por la acción del  $\text{Ca}^{2+}$  que resulto estar involucrado específicamente en la acción de la corticotropina. Comparativamente otros cationes como el  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ , mostraron que en sus concentraciones más efectivas estimularon aproximadamente la síntesis de la hormona en un 50 % ; así mismo otros cationes como el  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  mostraron sólo efectos inhibitorios (17), ver la Tabla I.

Por otro lado, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  han sido implicados en los procesos biosintéticos de esteroides en testículos, glándulas suprarrenales y ovarios (13,42), sin embargo en todos estos tejidos el AMPc esta considerado como el principal regulador intracelular de la producción de hormonas. Se ha reportado (2), que la placenta bovina puede asemejarse a la zona de la glomerulosa de la corteza suprarrenal, un tejido en el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  más bien parece ser la señal principal del incremento en la síntesis de aldosterona y no los nucleótidos cíclicos. Así mismo se reporta (35) que las células placentarias de bovino sintetizan progesterona y que su actividad esteroidogénica es estimulada por un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e independiente de nucleótidos

TABLA I

Estimulación en la producción total de corticoesteroides en homogenados de suprarrenales por varios cationes. Los valores debajo del encabezado de  $\text{Ca}^{2+}$  son valores control en ausencia o presencia del  $\text{Ca}^{2+}$ .

[ ] M	% de rendimiento			
	$\text{Sr}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ba}^{2+}$	$\text{Fe}^{2+}$
$2.5 \times 10^{-4}$				26.9
$5 \times 10^{-4}$	26.3			31.8
$1 \times 10^{-3}$	37.8	34.6		45.6
$2 \times 10^{-3}$				15.1
$5 \times 10^{-3}$	39.1	44.5	29.6	13.0
$1.5 \times 10^{-2}$	40.2	41.9		
$3 \times 10^{-2}$			49.0	
$3.5 \times 10^{-2}$	47.8			
$4 \times 10^{-2}$			43.1	
$5 \times 10^{-2}$	40.7			
	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$
0	26.6	30.9	24.5	26.2
$1.1 \times 10^{-3}$	54.1	66.2	49.6	56.6
$16.5 \times 10^{-3}$	75.4	94.9	74.9	79.1

( Tomado de Koritz y Cols. (17), 1959 )

cíclicos. Se desconoce si un proceso de control similar es empleado en la esteroidogénesis placentaria de otras especies. Hay reportes (25) de que la síntesis de progesterona en placenta humana es estimulada por la gonadotropina coriónica humana, presumiblemente por un mecanismo mediado por AMPc. Sin embargo el grado de estimulación producida es pequeña, abriéndose la posibilidad de un significativo papel del  $Ca^{2+}$ . Otros trabajos (16,35), han hecho notar que la esteroidogénesis, llevada a cabo en las células grandes del cuerpo luteo, no se regula por un incremento en los niveles del AMPc intracelular en tejidos de ovino y bovino. Shemesh y Cols. (36) demuestran que la disponibilidad de substrato extracelular como el colesterol influye en el sistema activador del  $Ca^{2+}$ , que modula la síntesis de progesterona en células placentarias de bovino.

Foster y Cols. (9) realizaron estudios en células de glomerulosa suprarrenal de bovino, en donde se emplearon concentraciones de calcio libre citosólico desde 1 a 100 nM, que les permitió analizar y cuantificar el papel del  $Ca^{2+}$  en la síntesis de aldosterona. Otro trabajo (2), encuentra que es activado un sistema mensajero que dispara la esteroidogénesis cuando los factores estimulantes llamados angiotensina II y  $K^+$  elevan la concentración del  $Ca^{2+}$ .

5. Estudios iniciales en la Placenta Humana. La consulta de trabajos que dieron inicio al estudio de la placenta humana a término, enfocados principalmente para determinar la capacidad de fosforilación oxidativa en mitocondrias aisladas (29), reportaron

haber encontrado una gran variabilidad e inestabilidad en este proceso. Fueron obtenidas bajas tasas de respiración, y el acoplamiento en la producción de ATP, fue impedido por la presencia de una fosfatasa activa que liberaba el fosfato del ATP y ADP, así como también fueron observadas relaciones P/O (bajas y variables), por lo que se sugirió que los resultados en la respiración no eran necesariamente consecuencia de una alteración funcional de la mitocondria. En otro trabajo (40) se demostró que la adición de albúmina sérica bovina a los homogenados previos para el aislamiento de mitocondrias, mejoró las relaciones P/O, no así la respiración. Se reportaron evidencias (5) de que la placenta contiene actividades de ATPasa y ADPasa a pH 8.8 y de AMPasa a 8.2, así como el aumento de fosfato por arriba de pH 9.5 es atribuido a la acción de la fosfatasa alcalina, aunque no pudo ser excluida una fosfatasa inespecífica en otros valores de pH.

6. Cadenas de transporte de electrones en la placenta humana. Otros autores (29,30), desarrollaron modificaciones para el aislamiento de mitocondrias, así como para buscar las condiciones de ensayo con las que se eliminaba la interferencia de las actividades de ATPasa y ADPasa, permitiéndose con esto el diferenciar y caracterizar las vías del transporte de electrones en la respiración, y al mismo tiempo los mecanismos de acoplamiento. Las preparaciones mitocondriales incubadas con diversas fuentes de equivalentes reductores, más el empleo de desacoplantes e inhibidores de la cadena respiratoria, produjeron buenas tasas de respiración, control respiratorio y relaciones

ADP/O, muy similares a las reportadas en mitocondrias de corteza suprarrenal de rata y bovino (1,34), y a las de cuerpo luteo de porcino y bovino (23,33). Se encontró que cerca del 20 % de la respiración mantenida con glutamato, fue insensible a la rotenona y debió proseguir por una vía alterna de transporte de electrones ligada al citocromo P-450. Por otro lado, conociendo que la combinación del ascorbato-TMPD, funciona como un donador artificial de electrones, los cuales por su potencial de óxido reducción son cedidos a nivel del citocromo c, se encontró que cerca del 50 % de la respiración mantenida con este substrato, fue insensible a 1 mM de cianuro, por lo que los electrones debieron utilizar una vía indefinida de la citocromo oxidasa (30).

Finalmente se encontró que el 100 % de la respiración, mantenida con glicerol-3-fosfato y succinato, sostuvo un rendimiento en la fosforilación oxidativa con una relación ADP/O de 2. Por otro lado, la inhibición con rotenona, antimicina A y cianuro, que bloquean los sitios de acoplamiento I, II y III respectivamente, permitió establecer que la cadena de transporte de electrones es la vía preferencialmente utilizada, empleando glutamato y succinato como substratos (30).

Es conocido que las mitocondrias de la corteza suprarrenal, testículo y ovario, además de poseer la cadena de transporte de electrones acoplada a la fosforilación oxidativa, también emplean una cadena de transporte de electrones alterna para la biosíntesis de hormonas esteroides. Algunas investigaciones en mitocondrias de placenta humana, han mostrado que posee características que le permiten tener cierta semejanza con estos tejidos

esteroidogénicos, ya que se le ha identificado una vía alterna que utiliza equivalentes reductores y oxígeno (24) por vía del citocromo P-450 (oxidasa terminal con función mixta), que hidroxila y cataliza la conversión del colesterol a pregnenolona (22). Esta cadena utiliza como aceptor final al oxígeno, el cuál es esencial para que el colesterol sea hidroxilado en las posiciones 20 y 22, y de esta manera permitir la liberación de la cadena lateral (Ácido isocaproico) por la acción de la enzima desmolasa 20,22, con la subsiguiente producción de pregnenolona que es transformada a progesterona por la acción de la 3-OH-esterol deshidrogenasa y la  $\Delta^{5-6}$  esterol isomerasa. Una vez que se produce esta hormona, sale de la mitocondria para ser distribuida tanto al feto como al torrente circulatorio y servir como materia prima precursora de la síntesis de hormonas esteroides. Esta cadena de transporte de electrones alterna es un sistema de monooxigenasa con substratos de tipo esteroidal, constituida por tres componentes localizados en la membrana interna de la mitocondria: una flavoproteína que contiene FAD específica para el  $\text{NADP}^+$ , una ferrosulfoproteína llamada adrenodoxina y el citocromo P-450.

Se sabe que la energía requerida para la activación de la cadena alterna es proporcionada por las diferentes reacciones mitocondriales acopladas a la reducción del  $\text{NADP}^+$ , y debido a que éste no puede atravesar la membrana interna, su principal fuente de equivalentes reductores esta limitada a substratos como malato e isocitrato, para los cuáles hay deshidrogenasas intramitocondriales dependientes del  $\text{NADP}^+$ . Para el caso del

malato existe una malato deshidrogenasa dependiente del  $\text{NAD}^+$  y una enzima málica dependiente del  $\text{NADP}^+$ . Por otro lado es importante señalar que estos substratos son igualmente importantes en la cadena de transporte de electrones acoplada a la fosforilación oxidativa, ya que son productores del  $\text{NADH}$ .

Otro punto de interés es la existencia en la cadena respiratoria de un proceso insensible a la oligomicina, que cede energía ligada a una transhidrogenasa que puede catalizar la transferencia de hidrógeno del  $\text{NADH}$  al  $\text{NADP}^+$  en mitocondrias de corteza suprarrenal (30) y placenta (10). Todo esto ha permitido sugerir que ambas cadenas son reguladas por mecanismos que determinan el camino de oxidación de los substratos.

#### 7. Características generales de la placenta humana a término.

El desarrollo gestacional en mamíferos está ligado anatómicamente, genéticamente y metabólicamente a la placenta: un órgano de existencia transitoria y de forma discoidal, en promedio con 20 cm de diámetro por 3 cm de grosor en su parte central; con 500 g de peso al momento del parto y que se encuentra adosado a la pared del útero. La placenta humana puede utilizarse como modelo experimental de incalculable valor, por varias razones: a) su origen; b) su diversidad de funciones; c) su fácil obtención. De especial importancia es su utilización en el área de investigación obstétrica, en particular, en el estudio de anomalías congénitas (21). Este órgano actúa en forma activa y selectiva en la transferencia de sustancias, desarrollando funciones nutritivas, renales, respiratorias, hepáticas y

endócrinas, esenciales para el feto. A medida que transcurre el embarazo se sintetizan en la placenta grandes cantidades de progesterona, alcanzando valores que oscilan entre 250 y 800 mg en 24 horas, en el último trimestre (37). La progesterona es necesaria para mantener el embarazo, además que se utiliza como precursor para la producción de otros derivados esteroidales, los cuáles actúan a su vez sobre varios órganos y tejidos, tanto de la madre como del feto.

## OBJETIVOS

Medir el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la respiración en MPH.

Medir el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la biosíntesis de P4 en MPH.

Ubicar el posible sitio de actividad de este catión en la cadena de transporte de electrones en MPH.

## MATERIAL Y METODOS

1. Aislamiento de las mitocondrias. -Las placentas humanas a término, se colectaron en el Hospital 20 de Noviembre del ISSSTE, dentro de los 30 min siguientes al parto. Fueron preparadas según el método descrito por Martínez y Cols. (20), en una solución de 250 mM de Sacarosa/ 1 mM de EDTA, ajustada a pH 7.3 con TRIS. El cordón umbilical se cortó, para drenar la sangre del tejido, luego se retiraron los coagulos y se procedió a cortar los cotiledones placentarios, que fueron colocados en la solución de Sacarosa/EDTA en frío (4°C). Posteriormente fueron lavados 3 ó 4 veces con la misma solución fría, para eliminar el exceso de sangre. Ya lavados, los cotiledones fueron cortados finamente para facilitar la homogenización, que se llevó a cabo en la solución de Sacarosa/ EDTA en frío, en un aparato Polytron (Brinkman Instruments), empleando al 30 % de su máxima potencia (120 voltios), dos golpes de 45 seg por un periodo de descanso de 15 seg. El homogenado fue filtrado para eliminar residuos no homogenizados y finalmente se ajustó el pH a 7.3 con TRIS. El homogenado se centrifugó a 3,500 rpm x 15 min a 4 °C en un rotor HS4, para una centrifuga Sorvall RC-5B. El precipitado se desecho y el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 10,000 rpm x 10 min a 4 °C en el rotor HS4. El precipitado mitocondrial fue

resuspendido cuidadosamente con la solución de Sacarosa / EDTA fría a un volumen final de 60 ml, para posteriormente centrifugar a 4,000 rpm x 4 min a 4 °C en un rotor SS34, para eliminar posibles residuos de eritrocitos. El sobrenadante obtenido, fue finalmente centrifugado a 12,000 rpm x 10 min a 4 °C en un rotor SS34. El paquete de mitocondrias obtenido, fue resuspendido en el mínimo de solución, y se almaceno en hielo para poder continuar los ensayos en el laboratorio. La Sacarosa y el EDTA empleados fueron de J.T. Baker, y el Tris fue de Merck.

2. Determinación de Proteínas.- La proteína mitocondrial (pm) fue determinada por el método de Lowry y *Cols.* (19), en el que las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un complejo coloreado, que es debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína (tal como sucede en el ensayo del Biuret) y a la reducción del fosfomolibdato por la tirosina y el triptófano presentes en la proteína. La intensidad del color, dependera del número de aminoácidos aromáticos presentes, y cambiara según la clase de proteína. Es un método espectrofotométrico con sensibilidad entre 1 y 200 µg. La preparación de soluciones empleadas fue como sigue:

- A) Solución alcalina de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 % en NaOH 0.1 N).
- B) Solución de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  al 5 %).
- C) Solución de tartrato de sodio y potasio ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_2$  al 2 %)
- D) Solución alcalina preparada el mismo día, mezclando primero 0.3 ml de solución B + 0.3 ml de solución C con

agitación, y aforando a 30 ml con la solución A con agitación.

E) Solución diluida 1:2 del reactivo de Folin-Ciocaltaeau en agua. Reactivo de Sigma.

F) Solución de albúmina sérica bovina (BSA) 4 mg / ml (patrón de proteína). Reactivo de Sigma Fracción V, libre de ácidos grasos.

CUADRO 1

Reactivos	Tubos		
	Blanco	Estandar	Muestra
H <sub>2</sub> O (ml)	1.0	0.95	0.99
Sol. F (μl)	-	50	-
Mitocondrias (μl)	-	-	10
Sol. D (ml)	4.0	4.0	4.0
	mezclar vigorosamente		
Sol. E (ml)	0.4	0.4	0.4
	mezclar vigorosamente		

Colocar los tubos durante 1 min en agua a ebullición, y enfriar en hielo hasta que se tenga la temperatura ambiente.

Se leyó en un fotocolorimetro Klett-Summerson, Mod. 800-3, con filtro rojo.

Los calculos se efectuaron, multiplicando las unidades Klett de la muestra por 20 (un factor calculado de acuerdo al estandar empleado), y el resultado fue dividido entre las unidades Klett del estandar, obteniendose así la concentración en mg/ml de pm.

3. Medición del consumo de oxígeno.- Para saber en que condiciones reales (acopladas, desacopladas o rotas) se encontraban las mitocondrias obtenidas por el método de centrifugación diferencial, fue necesario emplear esta técnica antes de cualquier intento de experimentar con ellas en este trabajo. Lograndose controles respiratorios por arriba de 3.5 hasta un máximo de 6.0. El consumo de oxígeno se estimó polarográficamente, empleando un electrodo tipo Clark de oxígeno y un Oxímetro Yellow Springs Instruments Co., Modelo 53.(YSI, Mod. 53), en un medio de incubación fresco que contenia: 250 mM de Sacarosa, 1 mM de EDTA, 10 mM de  $H_3PO_4$ , 10 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM de Succinato, 1 mM de EGTA, 0.1 % de BSA, ajustado a pH 7.3 con TRIS a 25 °C. En un volumen final de 3 ml de este medio de respiración básico y a 25 °C se adicionaron 3 mg de pm, dejandose incubar durante 1 min. La reacción dio inicio al adicionar ADP, a una concentración final de 100  $\mu M$ .

Finalmente los cálculos se hicieron, dividiendo los nanoatomos de oxígeno gastados por mg / min del estado 3, entre los nanoatomos de oxígeno por mg / min del estado 4, para obtener el control respiratorio. La relación ADP/O se determinó, dividiendo las nanomolas de ADP consumido, entre las nanomolas de oxígeno fijado.

4. Determinación colorimetrica del calcio total mitocondrial. Esta determinación se realizó con una técnica modificada a la que emplea el Dr. Federico Fernández Gabarrón de

este Departamento de Bioquímica. La extracción del calcio de la mitocondria fue como sigue: 10 mg de pm se diluyeron hasta 1.0 ml en agua destilada, y se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min a 25°C, en un rotor SM-24 de una centrifuga Sorvall RC-5B. El paquete y el sobrenadante siguieron el mismo proceso cada uno por separado, a los cuales se les adiciono 0.122 M de TCA más 0.122 M de NaOH para ajustar el pH a 7.0 y se aforó a 1.0 ml, y de nuevo se centrifuga a 15,000 rpm por 15 min a 25 °C. Es desechado el paquete, y el sobrenadante es empleado en la determinación del calcio. Un volumen final de 0.5 ml de solución TRIS-HCL 0.1 N a pH 7.0 contenía, 20  $\mu$ l de la muestra (obtenida de la extracción), 25  $\mu$ M de Arsenazo III, y se agito vigorosamente para dejar en reposo durante 5 min a 25 °C. La lectura fue hecha a una absorbencia de 654 nm en un espectrofotometro Beckman. Se determinó la concentración de calcio, por extrapolacion en una curva patrón de calcio.

5. Amortiguador  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA. Considera la contribución de todos los ligandos y iones metálicos, además las constantes de estabilidad aparentes a pH 7.20 fueron calculadas utilizando el programa de Fabiato & Fabiato (11). Los medios de incubación contenian: 0, 505, 806  $\mu$ M, 1.34, 1.54, 1.69, 1.74, 1.80, 1.86 y 1.95 mM de calcio total, dando concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  calculadas de 0, 50, 100, 300, 500, 800 nM, 1.0, 1.5, 2.0 y 5.0  $\mu$ M respectivamente en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ ; y , 0, 457, 744  $\mu$ M, 1.28, 1.50, 1.65, 1.71, 1.80, 1.85 y 1.94 mM de calcio total, dando concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  calculadas de 0, 50, 100, 300, 500,

800 nM, 1.0, 1.5, 2.0 y 5.0  $\mu\text{M}$  respectivamente en presencia de 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ . El 0 ( $10^{-9}$  M) es considerado como el control en todos los experimentos realizados. Estos valores de  $\text{Ca}^{2+}$  calculados fueron tomados del trabajo reportado por Moreno-Sánchez (26). Este medio de  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA permitió medir el consumo de oxígeno polarográficamente, empleando un electrodo tipo Clark de oxígeno y un Oxímetro (ISY, Mod. 53) Las mitocondrias se incubaron en un medio básico que contenía: 20 mM de MOPS, 120 mM de KCL, 2 mM de EGTA, 10 mM de Succinato, 0.1 % de BSA, y concentraciones crecientes de  $\text{CaCl}_2$  (las que correspondían a las calculadas para  $\text{Ca}^{2+}$ ), para luego ajustarse el pH a 7.20 con KOH o HCl. 2 mM de  $\text{MgCl}_2$  fue adicionado, cuando los experimentos así lo requirieron. A un volumen final de 3 ml de medio de respiración fresco, a 25 °C, se agregaron 3 mg de pm, dejándose incubar durante 2 min. La reacción dio inicio al añadir ADP, a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ .

6. Extracción en eter y determinación de P4. De los 3 ml del medio de respiración  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA empleados para medir el consumo de oxígeno en presencia de concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , se tomó 1 ml de cada uno de los experimentos a los 5 min de iniciada la reacción con ADP. Esta muestra de inmediato se congeló a -20 °C en una mezcla de acetona-hielo seco.

Posteriormente a la muestra ya descongelada se le adicionaron 5 ml de eter para un primer lavado de extracción, agitándose vigorosamente y dejándose reposar durante 90 seg a 25 °C hasta observar una interfase eter-precipitado, y después fue congelada

en la mezcla de acetona-hielo seco. El sobrenadante fue colectado en otro tubo, al que se puso en el baño a 38 °C hasta la evaporación completa del eter. Al precipitado ya descongelado del primer lavado, se sometió 2 veces más a nuevos lavados con eter, como anteriormente fue hecho. El residuo colectado de los tres lavados, después de haberse evaporado completamente el eter, fue diluido en 0.5 ml de cloroformo, con agitación vigorosa y de ahí se tomó una alicuota de 0.1 ml para hacer la determinación de la progesterona ( Método realizado por el Dr. Vicente Díaz Sánchez del INN "Salvador Zubirán") por radio-inmunoanálisis (RIA) con Ac, con una reacción cruzada menor al 1 % .

#### 7. Determinación de la actividad de ATPasa y (Pi).

La hidrólisis del ATP por la ATPasa, fue determinada en un medio de incubación básico que contenía: 20 mM de MOPS, 120 mM de KCL, 2 mM de EGTA, 5 mM de Malato, 5 mM de Glutamato y concentraciones crecientes de  $\text{CaCl}_2$  que van desde 1 nM hasta aproximadamente 2 mM (valores relacionados a las concentraciones calculadas para  $\text{Ca}^{2+}$ ), y finalmente el pH fue ajustado a 7.20 con KOH. A un volumen final de 1 ml de medio, preparado el mismo día y a 25 °C, se le adicionó 1 mg de pm, dejandose preincubando la mezcla durante 8 min en un baño a 30 °C con agitación constante. Posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{M}$  de DNP y 2.5 mM de ATP, dejandose hidrolizar durante 10 min en el baño a 30 °C con agitación constante. La reacción fue detenida con TCA al 6 % final, para precipitar la proteína. Se centrifugó a 3,000 rpm x 10 min a 2 °C, en una centrifuga Beckman Mod. TJ-6, y

el sobrenadante fue empleado en la determinación de fosfato, según el método colorimétrico de Sumner (39), basado en el principio de que el fosfato inorgánico (Pi), reacciona con el molibdato de amonio en solución ácida, para formar ácido fosfomolibdico que reacciona al adicionarse un agente reductor como el sulfato ferroso, que reduce el molibdeno presente en el fosfomolibdato, produciendo un color azul que permite leer indirectamente la actividad de ATPasa, sin afectar el ácido molibdico libre.

CUADRO 2

Reactivos	Tubos		
	Blanco	Estandar	Muestra
H <sub>2</sub> O (ml)	3.6	2.6	3.1
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1 mM (ml)	-	1.0	-
Muestra (ml)	-	-	0.5
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / Heptamolibdato de amonio al 6.6 % (ml)	1.0	1.0	1.0
	mezclar vigorosamente		
FeSO <sub>4</sub> al 10 % (ml)	0.4	0.4	0.4
	mezclar vigorosamente		

Lectura en un fotocolorimetro Klett-Summerson con filtro rojo.

$$\text{Cálculos: } \frac{\text{UK muestra}}{\text{UK estandar}} \times 2 = \text{micromolas de Pi} \times \text{mg}^{-1} \times 10 \text{ min}^{-1}$$

8. Determinación espectrofotométrica sobre 5 segmentos de la cadena de transporte de electrones.

Fragmento NADH-DCPIP.- Se incubaron: 20 mM de MOPS a pH 7.4, 120 mM de KCL, 2 mM de EGTA, 2 mM de  $H_3PO_4$ , 0.1 % de BSA, 100  $\mu M$  de KCN, 1.0  $\mu g$  de Antimicina, 200  $\mu M$  de NADH, cantidades crecientes de  $CaCl_2$  relacionadas a las concentraciones de  $Ca^{2+}$ , el pH a 7.20, en un volumen final de 1.0 ml de medio de incubación fresco. Se adicionaron 0.125 mg de pm. Y para dar inicio a la reacción se agregaron 160  $\mu M$  de DCPIP. Las condiciones de ensayo controladas, se realizaron en el espectrofotómetro de doble haz de luz (AMINCO, DW-2A), y fueron: a 25 °C, 3.0 mm de abertura, una velocidad de registro de 20 seg/pulg, una sensibilidad de 2.0 de absorbencia, una longitud de onda de 590 nm en el Monocromador 1 y de 600 nm en el Monocromador 2. Para calcular la actividad específica, se multiplicó el  $\Delta$  absorbencia  $mg^{-1}.min^{-1} \times 21$  (CEM), para dar el resultado en micromolas de DCPIP reducido  $mg^{-1}.min^{-1}$ .

Fragmento Succinato-DCPIP.- Se incubaron: 20 mM de MOPS a pH 7.4, 120 mM de KCL, 2 mM de EGTA, 2mM de  $H_3PO_4$ , 0.1 % de BSA, 100  $\mu M$  de KCN, 5  $\mu M$  de Rotenona, 1.1 mM de PMS, 20 mM de Succinato, cantidades crecientes de  $CaCl_2$  y pH 7.20, en un volumen final de 1.0 ml de este medio de incubación fresco. Se adicionaron 0.5 mg de pm y para dar inicio a la reacción, se agregaron 80  $\mu M$  de DCPIP. Las condiciones de ensayo controladas, se realizaron en el espectrofotómetro AMINCO DW-2A y fueron a 25 °C, 3.0 mm de abertura, una velocidad de registro de 100 seg/pulg, una

sensibilidad de 2.0 de absorbencia, una longitud de onda de 590 nm en el Monocromador 1 y de 600 nm en el Monocromador 2. Para calcular la actividad especifica se multiplicó igual al fragmento NADH-DCPIP.

Fragmento Succinato-Citocromo c.- Se incubaron: 20 mM de MOPS, 120 mM de KCL, 2 mM de EGTA, 2 mM de  $H_2PO_4$ , 0.1 % de BSA, 100  $\mu$ M de KCN, 5  $\mu$ g de Rotenona, 20 mM de Succinato, cantidades crecientes de  $CaCl_2$  y pH 7.20 en un volumen final de 1.0 ml de este medio de incubación fresco. Se adicionaron 2 mg de pm, y para dar inicio a la reacción se agregaron 0.25 mg de Citocromo c. Las condiciones de ensayo controladas se realizaron en el espectrofotómetro AMINCO DW-2A, y fueron: a 25 °C, una sensibilidad 2.0 de absorbencia, 3.0 mm de abertura, una velocidad de registro de 100 seg/pulg, una longitud de onda de 590 en el Monocromador 1 y de 600 nm en el Monocromador 2. Para calcular la actividad especifica, se multiplicó la absorbencia  $mg^{-1} \cdot min^{-1} \times 19$  (CEM) para dar el resultado en micromolas de citocromo c reducido  $mg^{-1} \cdot min^{-1}$ .

Fragmento NADH-Citocromo c.- Se incubaron: 20 mM de MOPS, 120 mM de KCl, 2 mM de EGTA, 2 mM de  $H_2PO_4$ , 0,1 % de BSA, 100  $\mu$ M de KCN, 5  $\mu$ M de NADH, cantidades crecientes de  $CaCl_2$  y pH 7.20, en un volumen final de 1.0 ml de este medio de incubación fresco. Se adicionaron 3 de mg de pm, y para dar inicio a la reacción se agregaron 0.25 mg de citocromo c. Las condiciones de ensayo controladas, se realizaron en el espectrofotómetro AMINCO DW-2A y

fueron: a 25 °C, una sensibilidad de 0.5 de absorbencia, 3.0 mm de abertura, una velocidad de registro de 100 seg/pulg, una longitud de onda de 590 nm en el Monocromador 1 y de 600 nm en el Monocromador 2. Para calcular la actividad específica, se multiplicó igual al fragmento Succinato-Citocromo c.

**Fragmento Citocromo c-Citocromo  $\alpha_3$ .**- Se incubaron: 20 mM de MOPS, 120 mM de KCL, 2 mM de EGTA, 2 mM de  $H_3PO_4$ , 0.1 % de BSA, 1  $\mu$ g de antimicina, 5 mM de Ascorbato, cantidades crecientes de  $CaCl_2$  y pH 7.20 en un volumen final de 3 ml de este medio de incubación fresco. Se adicionaron 3 mg de pm, dejándose 2 min incubando con agitación constante, y después se dio inicio a la reacción, al agregar 50  $\mu$ M de TMPD. Las condiciones de ensayo controladas, se realizaron polarográficamente con un electrodo tipo Clark de oxígeno y un Oxímetro (YSI, Mod. 53) y fueron a 25 °C. A los 4 min de iniciada la reacción, fue detenida con la adición de 100  $\mu$ M de KCN.

**9. Preparación de partículas submitocondriales (PSM).**- Las mitocondrias obtenidas por el método descrito por Martínez y *cols.* (20) fueron expuestas a sonicación (Técnica empleada para la preparación por la Q.F.B. Ma. Teresa Espinoza García), que condujo a la formación de vesículas de membrana interna mitocondrial "volteadas", de manera que las unidades fosforilantes se localizan en el exterior. Con estas partículas, se pudieron determinar las propiedades de la superficie interior de la membrana interna mitocondrial. La preparación empieza diluyendo las mitocondrias

en solución de Sacarosa-EDTA a pH 7.3, de 5 a 7 mg/ml, pH 8.2. Se sonicó a la máxima potencia (30 micrones) en un baño de hielo, en volúmenes aproximados de 50 ml durante 3 periodos de 45 seg cada uno, con intervalos de 2 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C, en un rotor SS-34. El sobrenadante se ultracentrifugó a 55,000 rpm por 60 min a 4 °C, en un rotor 60 Ti # 1945 para una ultracentrifuga Beckman Mod.L5-65. El paquete resultante fue resuspendido en solución de Sacarosa-EDTA a pH 7.3. El sonicador empleado fue un MSE, Mod. Soniprep 150.

## V RESULTADOS

Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la respiración en MPH.

Para medir el consumo de oxígeno en MPH se manipularon concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ . Se puede observar en la figura 1 que la velocidad de respiración estimulada por ADP (estado 3) es inhibida aproximadamente en un 70% cuando la concentración del catión se encuentra entre 0.1 a 5.0  $\mu\text{M}$ . Esto sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  podría interferir con el paso de los electrones a través de la cadena respiratoria hasta su aceptor final que es el oxígeno, posiblemente por interacción directa con sus componentes.

Se ha demostrado que el  $\text{Mg}^{2+}$  es un catión necesario para las funciones mitocondriales, como es la fosforilación oxidativa, en donde el  $\text{Mg}^{2+}$  se acompleja al ADP para funcionar como sustrato verdadero de la ATPsintetasa. También se ha descrito su papel en los procesos de estabilización membranal, por mencionar algunos. En la figura 2 se muestra el efecto que produce el  $\text{Mg}^{2+}$  a una concentración constante de 2 mM en presencia de concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , y el estudio comparativo de los resultados muestran que la respiración entre 1 y 100 nM disminuye aproximadamente en un 30% en relación a lo observado en la figura 1. Además de esto, a concentraciones de 0.3 a 5.0  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  el efecto es similar al que se observa en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , en donde es apreciada una inhibición de la respiración, básicamente

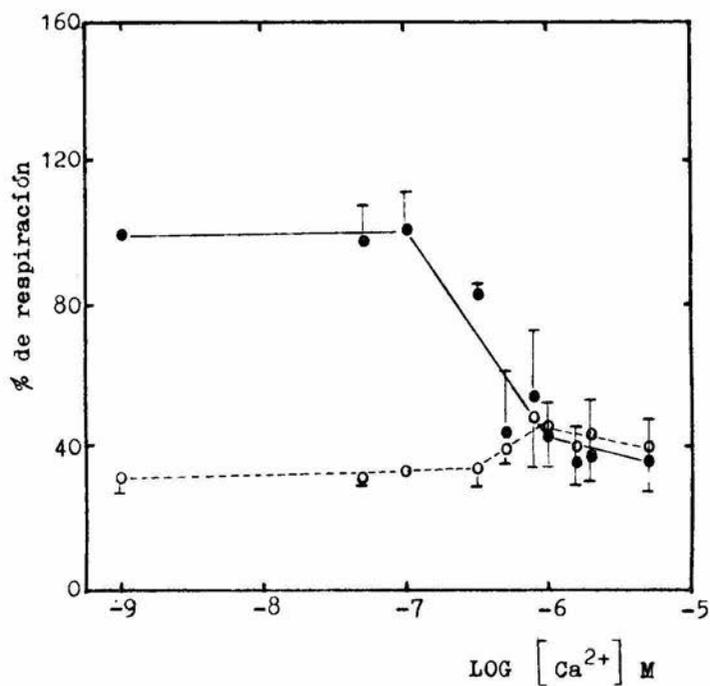


Fig. 1. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre los estados 3 (●-●) y 4 (○-○) de la respiraci3n en MPH en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ . Un volumen final de 3 ml de medio de  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA fresco a pH 7.20 y 25 °C contenía el  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 mg de pm y 100  $\mu\text{M}$  de ADP para estimular la respiraci3n.  $n = 3$

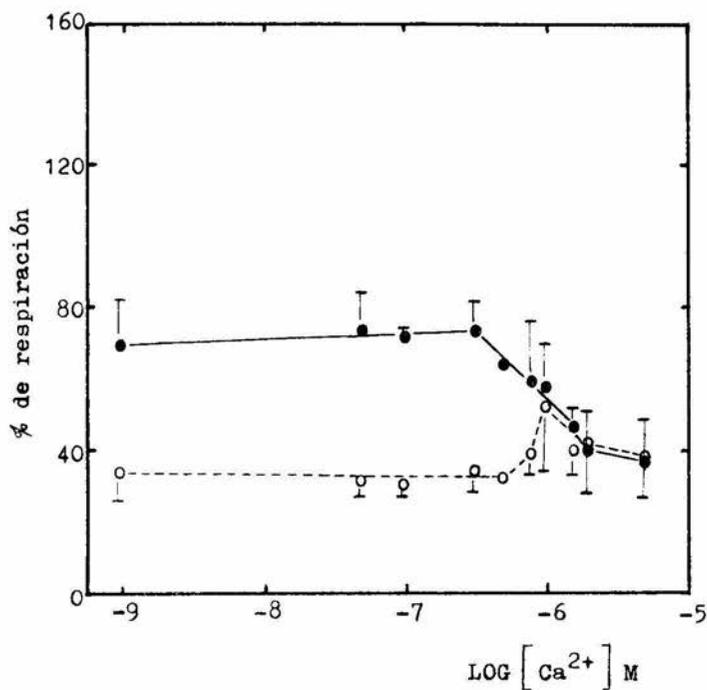


Fig. 2. Efecto del Ca<sup>2+</sup> sobre los estados 3 (●-●) y 4 (○-○) de la respiración en MPH con 2 mM de MgCl<sub>2</sub>. Un volumen final de 3 ml de medio de Ca<sup>2+</sup>-EGTA fresco a pH 7.20 y 25 °C contenía el Ca<sup>2+</sup>, 3 mg de pm y 100 μM de ADP para estimular la respiración. n = 3.

del estado 3.

Una manera mas clara de reconocer el grado de acoplamiento entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa es empleando un parametro muy usado en bioenergética, el control respiratorio. La figura 3 nos muestra el efecto que sobre el control respiratorio produce el  $\text{Ca}^{2+}$ , en donde se observa que hay una inhibición del 70 % a medida que la concentración del catión se incrementa. Comparativamente un resultado similar es observado cuando hay  $\text{Mg}^{2+}$  en el medio de respiración. Este dato nos sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  esta produciendo un desacoplamiento entre la respiración y la síntesis de ATP.

#### Efecto del $\text{Ca}^{2+}$ sobre la biosíntesis de P4 en MPH.

La figura 4 muestra que el  $\text{Ca}^{2+}$  produce un incremento transitorio en la síntesis de P4 al aproximarse a 500 nM. Es importante señalar que las determinaciones sobre la síntesis de P4 se hicieron con las mismas preparaciones utilizadas en la respiración. Se observa que la síntesis de la hormona ocurre precisamente en el intervalo en que la respiración es inhibida.

La presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  no permite el estímulo en la producción hormonal, como se observa en la figura 5. Este resultado podría ser interpretado bajo los antecedentes bibliográficos (3), de que el  $\text{Mg}^{2+}$  es capaz de bloquear el paso del  $\text{Ca}^{2+}$  a la matriz mitocondrial.

Los resultados presentados hasta aquí, sugieren que el  $\text{Ca}^{2+}$  interfiere en las funciones respiratorias de las MPH.

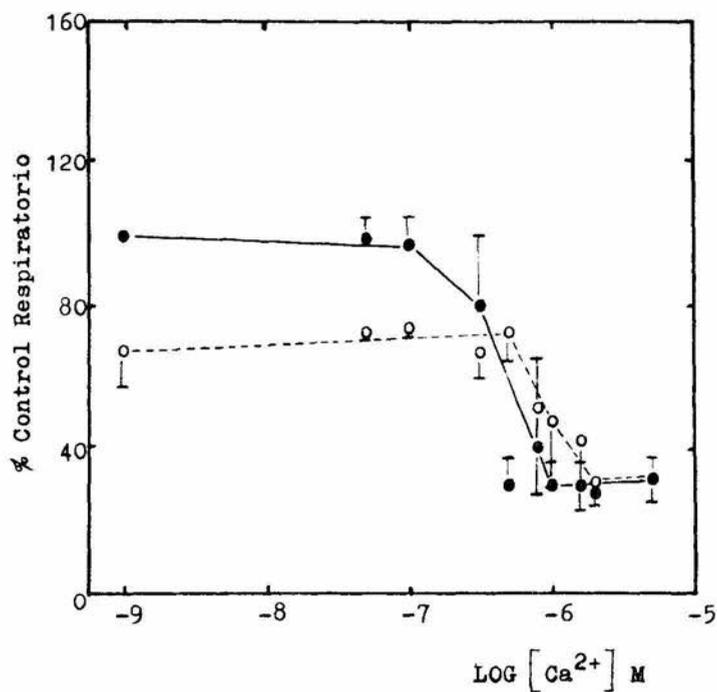


Fig. 3. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el control respiratorio de las MPH con 2 mM de  $\text{MgCl}_2$  (●-●) y sin  $\text{Mg}^{2+}$  (○-○). Un volumen final de 3 ml de medio de  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA fresco a pH 7.20 y 25 °C contenía el  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 mg de pm y 100  $\mu\text{M}$  de ADP para estimular la respiración.  $n = 3$ .

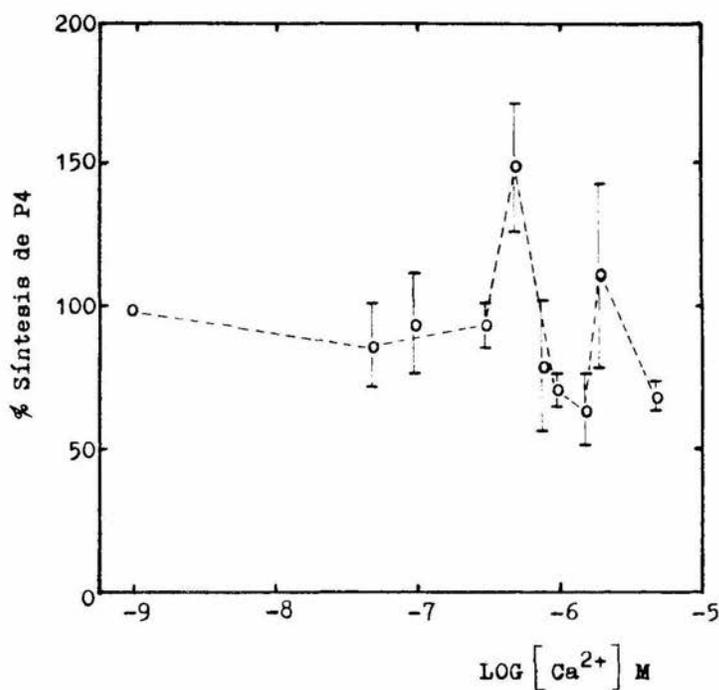


Fig. 4. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la síntesis de P4 en MPH en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ . Un volumen final de 3 ml de medio de  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA fresco a pH 7.20 y 25 °C contenía el  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 mg de pm y 100  $\mu\text{M}$  de ADP para estimular la respiración. La P4 fue extraída de este medio de respiración con eter y su determinación por RIA (ver Material y Métodos). n = 3.

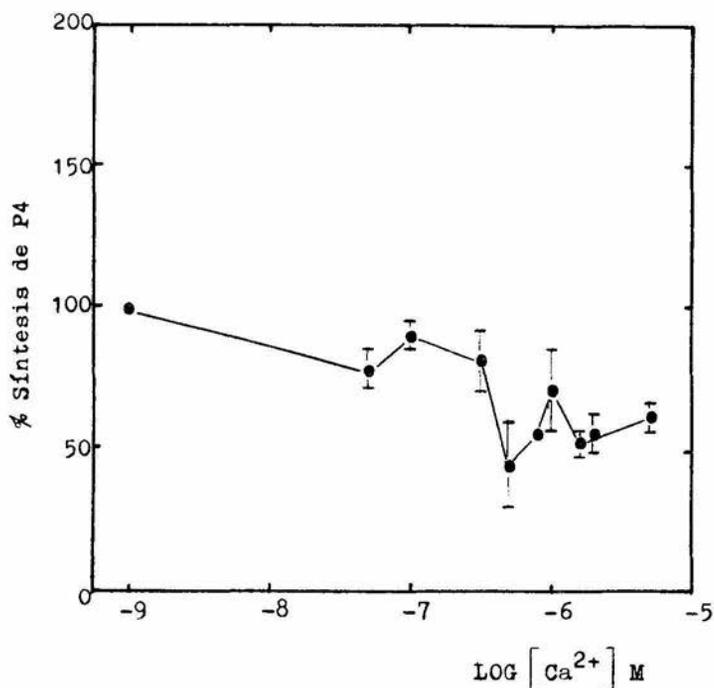


Fig. 5. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la síntesis de P4 en MPH en presencia de 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Un volumen final de 3 ml de medio de  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA fresco a pH 7.20 y 25 °C contenía el  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 mg de pm y 100  $\mu\text{M}$  de ADP para estimular la respiración. La P4 fue extraída de este medio de respiración con eter y su determinación por RIA (ver Material y Métodos). n = 3.

### Efecto del $\text{Ca}^{2+}$ sobre la Cadena de Transporte de Electrones.

Para determinar el posible sitio de actividad del catión sobre la cadena de transporte de electrones, decidimos segmentarla utilizando rotenona, antimicina A y cianuro, que inhiben específicamente los sitios I, II y III respectivamente. Proporcionando a su vez los equivalentes reductores el NADH, succinato, o bien donadores artificiales de electrones como el citocromo c y el ascorbato-TMPD.

El fragmento NADH-DCPIP que muestra la figura 6, nos explica que a concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , la reducción del DCPIP en MPH no se da en el mismo grado de inhibición que el observado en la respiración. La velocidad de reducción de este aceptor artificial de electrones debiera ser tomada con precaución ya que se ha sugerido que el DCPIP podría no atravesar la membrana. Por esta razón fue necesario repetir el mismo experimento utilizando PSM como es mostrado en la figura 7, en donde se produce una estimulación de la actividad de este segmento. La comparación de estos resultados muestran que la velocidad de transporte de electrones es diferente cuando son empleadas MPH o PSM.

Los resultados obtenidos sobre el segmento succinato-DCPIP, indican que cuando son empleadas MPH el  $\text{Ca}^{2+}$  produce una inhibición que no es comparable con los resultados mostrados en la respiración como se observa en la figura 8. Por otro lado, este mismo experimento realizado en PSM presenta una inhibición menos pronunciada como se observa en la figura 9.

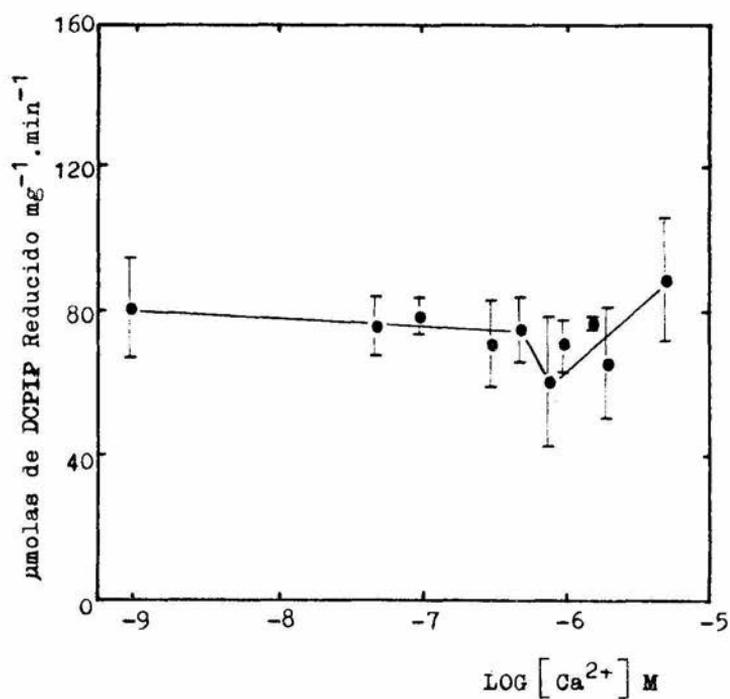


Fig. 6. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en el fragmento NADH-DCPIP de la cadena de transporte de electrones en MPH. Un volumen final de 1 ml de medio de  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA fresco a pH 7.20 y 25 °C (ver Material y Métodos) contenía el  $\text{Ca}^{2+}$ , 0.125 mg de pm y 160  $\mu\text{M}$  de DCPIP para iniciar la reacción. n = 3.

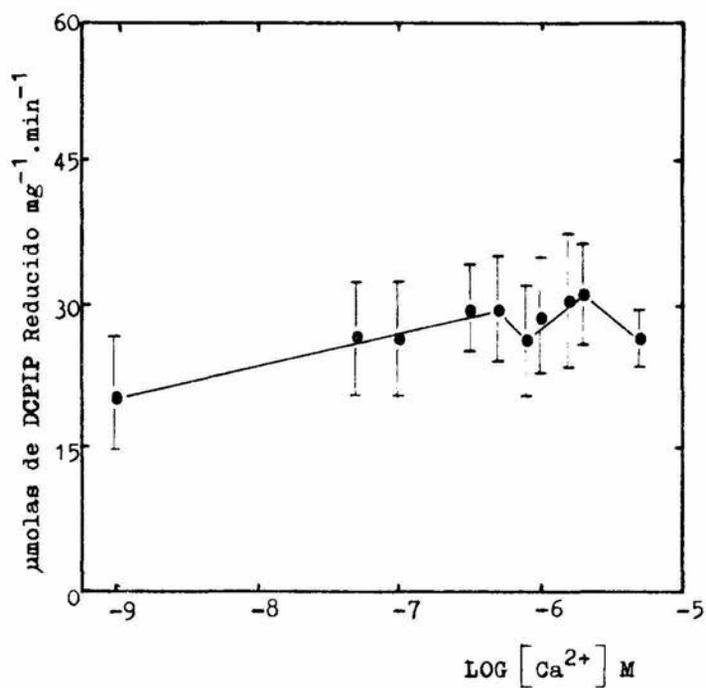


Fig. 7. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en el fragmento NADH-DCPIP de la cadena de transporte de electrones en PSM de MPH. Iguales condiciones experimentales a las descritas en la figura 6.  $n = 3$ .

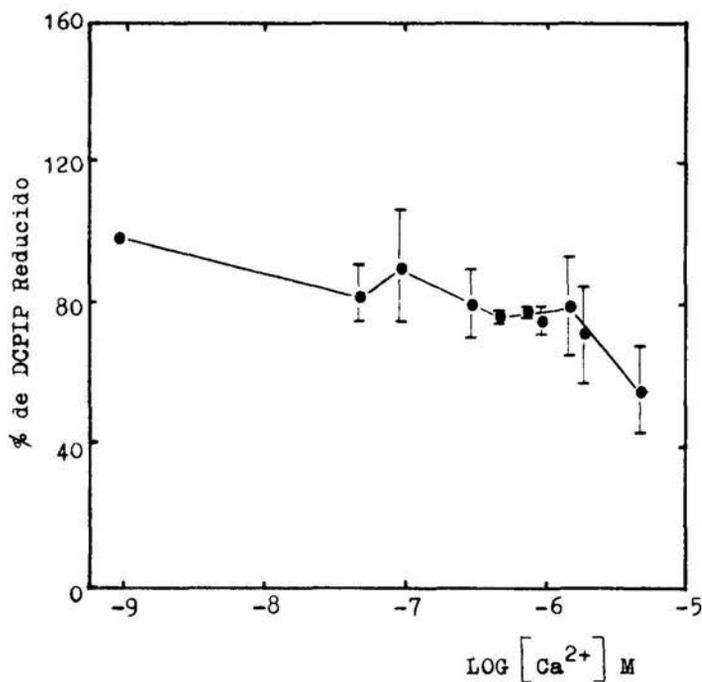


Fig. 8. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en el fragmento succinato-DCPIP de la cadena de transporte de electrones en MPH. Un volumen final de 1 ml de medio de  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA fresco a pH 7.20 y 25 °C (ver Material y Métodos) contenía el  $\text{Ca}^{2+}$ , 0.5 mg de pm y 80  $\mu\text{M}$  de DCPIP para iniciar la reacción. n = 3.

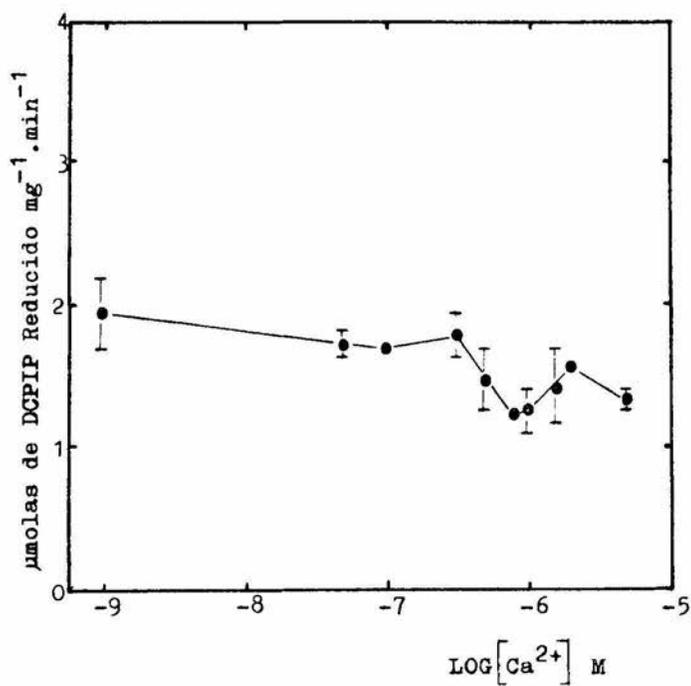


Fig. 9. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en el fragmento succinato-DCFIP de la cadena de transporte de electrones en PSM de MPH. Iguales condiciones experimentales a las descritas en la figura 8.  $n = 2$ .

Los resultados obtenidos sobre los segmentos NADH-citocromo *c* (Figura 10) y succinato-citocromo *c* (Figura 11) muestran un comportamiento similar al incrementar las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , esto es, la reducción del citocromo *c* se ve estimulada.

El segmento correspondiente a la citocromo oxidasa (Figura 12) no muestra cambios apreciables a ninguna de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  estudiadas. Hasta aquí, estos resultados analizados en conjunto muestran que la cadena de transporte de electrones se ve más bien estimulada por la presencia del  $\text{Ca}^{2+}$  que inhibida de una manera significativa, lo que sugiere que el mecanismo de inhibición sobre la respiración inducida por este catión no se realiza a este nivel.

#### Efecto del $\text{Ca}^{2+}$ sobre la actividad de ATPasa.

Otro posible sitio de interacción del catión podría ser la ATPasa o ATPsintetasa lo que podría explicar el efecto inhibitorio de la respiración y a su vez el efecto estimulatorio en la síntesis de P4.

Por tal motivo fue de interés estudiar el efecto que tiene el ion sobre la actividad de la ATPasa mitocondrial. Los resultados muestran que el  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la actividad de esta enzima principalmente a altas concentraciones del ion como se muestra en la figura 13.

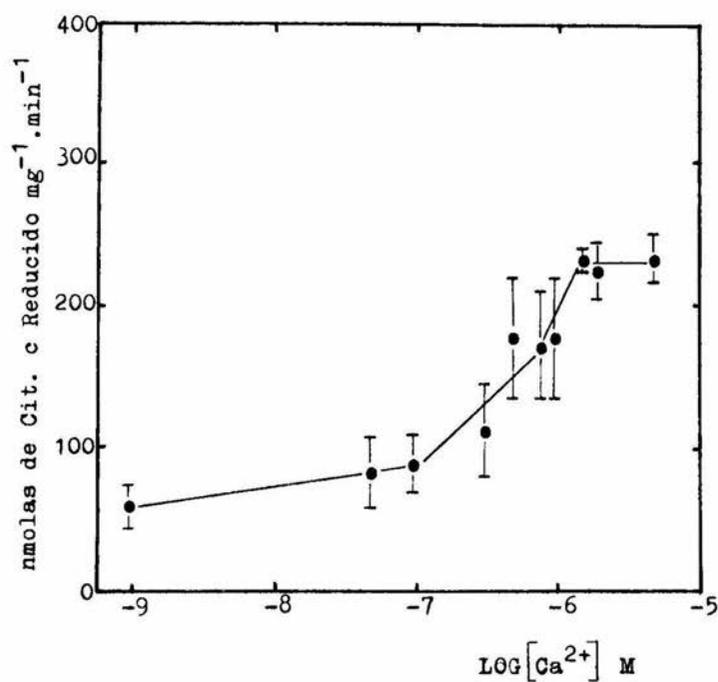


Fig. 10. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en el fragmento NADH-citocromo *c* de la cadena de transporte de electrones en MPH. Un volumen final de 1 ml de medio de  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA fresco a pH 7.20 y 25 °C (ver Material y Métodos) contenía el  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 mg pm y 0.25 mg de citocromo *c* para iniciar la reacción.  $n = 2$ .

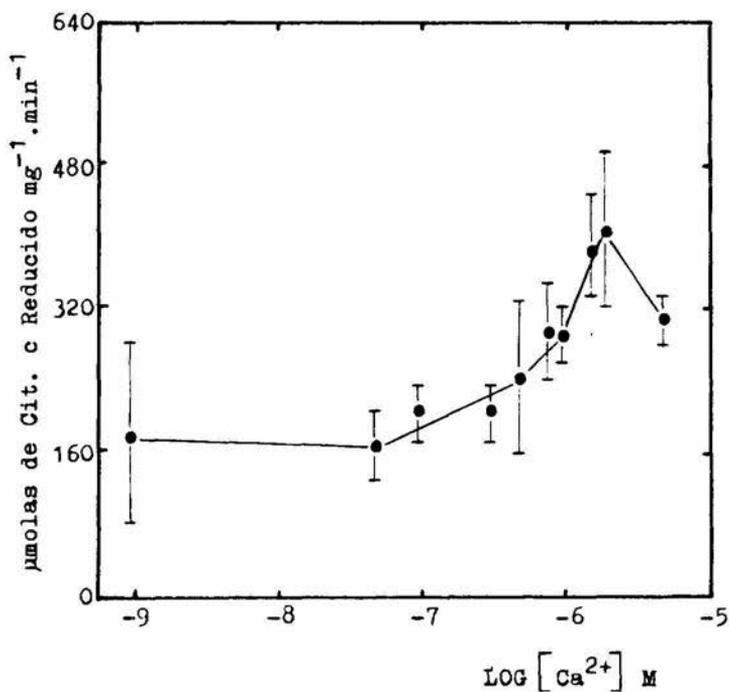


Fig. 11. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en el fragmento succinato-citocromo *c* de la cadena de transporte de electrones en MPH. Un volumen final de 1 ml de medio de  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA fresco a pH 7.20 y 25 °C (ver Material y Métodos) contenía el  $\text{Ca}^{2+}$ , 2 mg de pm y 0.25 mg de citocromo *c* para iniciar la reacción.  $n = 3$ .

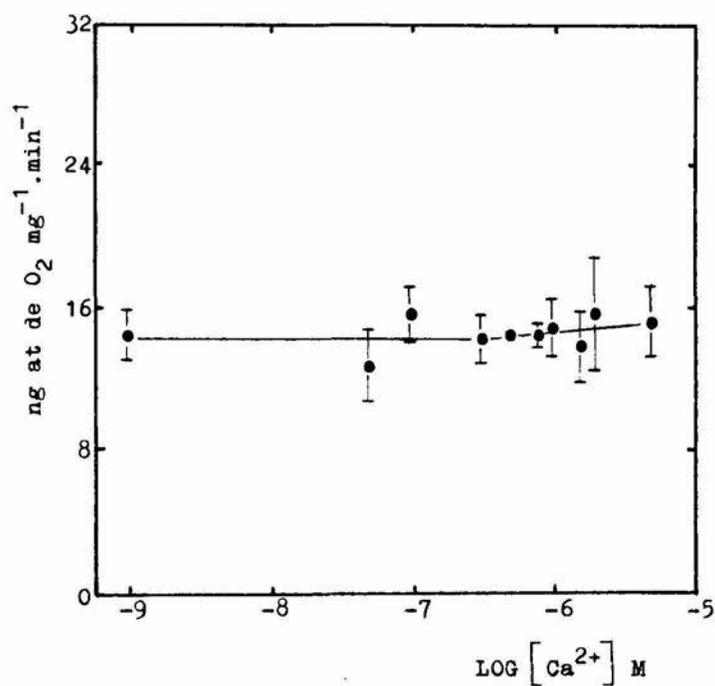


Fig. 12. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en el fragmento citocromo c-citocromo  $\alpha_3$  de la cadena de transporte de electrones en MPH. Un volumen final de 3 ml de medio de  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA fresco a pH 7.20 y 25 °C (ver Material y Métodos) contenía el  $\text{Ca}^{2+}$ , 3 mg de pm y 50  $\mu\text{M}$  de TMPD para iniciar la reacción. n = 3.

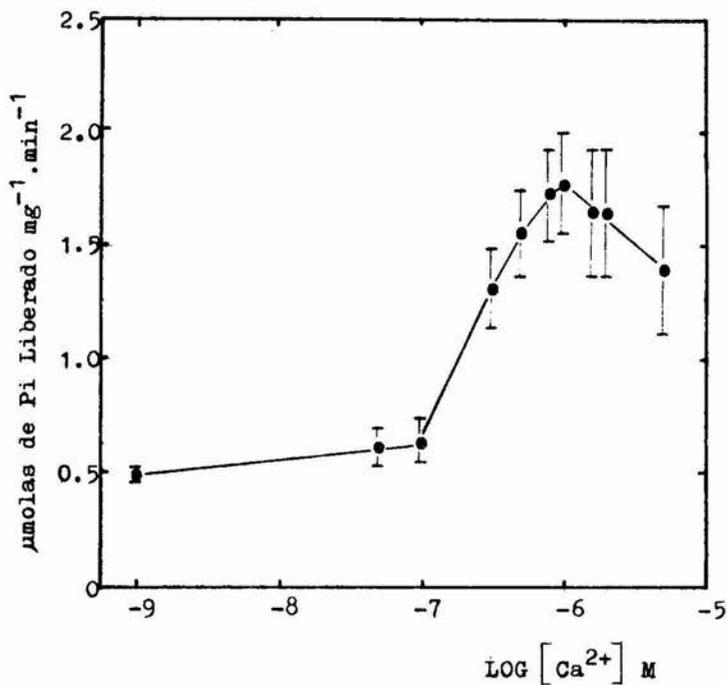


Fig. 13. Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en la actividad de ATPasa en MPH. Un volumen final de 1 ml de medio de  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA fresco a pH 7.20 (ver Material y Métodos) contenía el  $\text{Ca}^{2+}$ , 1 mg de pm, 50  $\mu\text{M}$  de DNP y 2.5 mM de ATP.  $n = 2$ .

## VI DISCUSION

El proposito de este trabajo fue investigar el efecto de un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  en el rango fisiológico sobre la respiración y biosíntesis de P4, así como un posible sitio de actividad a nivel de la cadena de transporte de electrones y de la ATPasa en MPH acopladas.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en presencia de un amortiguador  $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA que nos permitió manipular concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$  calculadas (8,26). La presencia de EDTA como un agente quelante evita las reacciones características de los iones metálicos al formar complejos solubles con todos los cationes en relación molar 1:1, y del EGTA que reacciona específicamente al quelar  $\text{Ca}^{2+}$ . Con estos reactivos se pudieron mantener las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  adecuadas en cada uno de los experimentos.

Se ha reportado (14) en mitocondrias de hígado que la respiración no resulta afectada por el  $\text{Ca}^{2+}$ , debido posiblemente a un alto contenido de calcio endógeno que pudiera ocultar los efectos, aunque se ha argumentado también que pudiera deberse a diversos factores, que contribuyen a las dificultades experimentadas por otros, en demostrar un incremento en la respiración, en respuesta al  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, Johnston y Cols. (14), empleando una técnica simple para producir una preparación de mitocondrias de hígado de rata con un bajo contenido de

calcio endógeno ( aproximadamente 1 nmol/mg de proteína ), valor similar al encontrado *in vivo*, reportan que la respiración en presencia del piruvato, 2 oxoglutarato o treo-(D<sub>3</sub>)-isocitrato puede ser estimulada por el Ca<sup>2+</sup> al ser incrementado desde 103 a 820 nM (intervalo fisiológico), pero no hubo estimulación de la respiración cuando el succinato fue el sustrato.

Robertson y *Cols.* (32), reportan que en mitocondrias de corazón el Ca<sup>2+</sup> induce un estímulo en la fosforilación oxidativa del 25 % en el intervalo 0.1 a 1.0 μM de Ca<sup>2+</sup> y un efecto inhibitorio al emplear cantidades superiores a 1.0 μM, sin tomar en cuenta la presencia del Mg<sup>2+</sup>.

Moreno-Sánchez (26), reporta en un estudio realizado en mitocondrias de hígado que la regulación de la fosforilación oxidativa es debida aparentemente al control del nivel del calcio endógeno por el Ca<sup>2+</sup>. Encontró que hay una concentración de Ca<sup>2+</sup> al cual la síntesis de ATP máxima tiene lugar, pero ésta puede variar con la presencia o ausencia del Mg<sup>2+</sup> y con la concentración de fosfato en el medio.

En este trabajo se ha observado que cuando la concentración del Ca<sup>2+</sup> fue incrementada de 0.1 a 5.0 μM, la respiración en el estado 3 inducida por el ADP fue inhibida en un 70 %.

Históricamente, el calcio ha sido muy estudiado (18) y es bien conocido hasta ahora que juega un papel muy importante como un segundo mensajero en la regulación de muchas actividades celulares, siendo una de ellas como mensajero intracelular de la acción hormonal (2). Shemesh y *Cols.* (35), trabajando en células placentarias de bovino, encontraron evidencias de que el Ca<sup>2+</sup> es

la llave mediadora en la síntesis de la P4, en contraste con otras glándulas esteroideogénicas en el cuál los nucleótidos cíclicos modulan la formación de la hormona.

Los resultados obtenidos en este trabajo sobre la biosíntesis de la P4 nos muestran que esta ocurre, aunque sea sólo transitoriamente a 500 nM de  $\text{Ca}^{2+}$ . El hecho de que esta estimulación de la hormona ocurra dentro del intervalo de inhibición de la respiración (0.1 a 5.0  $\mu\text{M}$ ), nos muestra evidencia clara de que efectivamente el  $\text{Ca}^{2+}$  si interviene de alguna manera en la síntesis de la P4 en MPH a término.

Hasta aquí, los datos presentados en este trabajo nos permiten sugerir la existencia de mecanismos que regulan la desviación de los equivalentes reductores para favorecer una vía de transporte e inhibir otra.

Datos de Klimek y Cols. (15) apoyan los datos presentados en este trabajo, ya que sugiere que la inhibición de la síntesis de ATP con oligomicina produce un incremento en la producción de P4, y también sugiere que esto se debe porque los equivalentes producidos al no poder ingresar a la cadena de transporte de electrones se desvían hacia la cadena del citocromo P-450. Estos datos podrían sugerir que el calcio está haciendo lo mismo en las mitocondrias.

Por otro lado, en este trabajo las MPH incubadas con 2 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ , disminuyeron en un 30 % su velocidad respiratoria en el intervalo 1 a 100 nM de  $\text{Ca}^{2+}$ , así mismo, la estimulación en la síntesis de P4 no se presentó. Por lo que, este efecto que interfiere en la acción del  $\text{Ca}^{2+}$ , sería debido al  $\text{Mg}^{2+}$  que es

reconocido (7) como un eficiente inhibidor del uniportador electroforético (acarreador transmembranal que aporta una carga neta de 1) que mete el  $\text{Ca}^{2+}$  a la matriz mitocondrial. En corazón, 1 mM de  $\text{Mg}^{2+}$  citoplásmico cambia la  $K_m$  de  $\text{Ca}^{2+}$  de 10 a 30  $\mu\text{M}$  (6).

Los datos obtenidos por efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre los componentes de la cadena de transporte de electrones hacen suponer que éste no es el posible sitio de actividad, ya que hubo estimulación en algunos fragmentos y en otros la inhibición no fue significativa.

El otro posible sitio de actividad del catión fue la ATPasa, en donde la actividad de la enzima se vio estimulada por el  $\text{Ca}^{2+}$  en el intervalo de concentración en donde fue observada la inhibición de la respiración. Los datos sugieren que el catión debe producir sus efectos a otro nivel, posiblemente bloqueando el paso de nucleótidos de adenina, como ha sido propuesto por Gómez-Puyou y *Colz.* (11).

Si bien el lugar exacto de la acción del calcio en los procesos esteroideogénicos aun no es conocido, es probable que pudiera influir la liberación del colesterol por la mitocondria (12). También se puede sugerir que en la mitocondria de la placenta exista un mecanismo mediado por  $\text{Ca}^{2+}$ , diferente al postulado para el AMPc, que es capaz de estimular la transformación del colesterol en progesterona.

## VII CONCLUSIONES

Del estudio de esta tesis obtenemos que:

1. La respiración en MPH puede ser inhibida significativamente dentro del rango fisiológico (0.1 a 1.0  $\mu\text{M}$ ) por efecto del  $\text{Ca}^{2+}$ .

2. La biosíntesis de P4 en MPH pudo ser estimulada aunque sólo transitoriamente a 500 nM de  $\text{Ca}^{2+}$ , cuando el efecto de este catión en la respiración estuvo presente.

3. La presencia del  $\text{Mg}^{2+}$  disminuye la velocidad respiratoria a bajas concentraciones del catión en el intervalo 1 a 100 nM de  $\text{Ca}^{2+}$ , y también es claro que desaparece el estímulo en la biosíntesis de P4. Por todo esto, se sugiere que el  $\text{Mg}^{2+}$  interfiere con los efectos causados por el  $\text{Ca}^{2+}$  en estas funciones mitocondriales.

4. Al segmentar la cadena de transporte de electrones algunos fragmentos son estimulados y en otros no se presenta una inhibición significativa que pudiera ubicar un posible sitio de actividad del  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo que se sugiere que el catión no actúa a este nivel de la cadena y se abre la posibilidad de que su participación ocurra a otro nivel.

5. Al ser estimulada la actividad de ATPasa directamente por el  $\text{Ca}^{2+}$ , se sugiere que indirectamente la actividad de síntesis de ATP no se ve afectada y por lo que se plantea que tampoco es a este nivel un posible sitio de actividad del catión.

## REFERENCIAS

1. Cammer W. and Estabrook R. W. (1967) Respirator activity of adrenal cortex mitochondria during steroid hydroxilation. Arch. biochem. Biophys. 122, 721-734
2. Capponi A. M., Lew P. D. and Valloton M. B. (1987) Quantitative analysis of the cytosolic-free-Ca<sup>2+</sup>-dependency of aldosterona productions in bovine adrenal glomerulos a cells. Biochem. J. 247, 335-340
3. Carafoli E. (1979) The calcium cycle of mitochondria. FEBS Lett. 104, 1-5
4. Carafoli E. (1986) Mitochondrial Pathology: An overview. Ann. New York Acad. Sci. 488, 1-18
5. Cerletti P., Frontocelli C. and Zichella L. (1960) Adenosine nucleotidases of human placenta. Clin. Chim. Acta 5, 439-443
6. Crompton M., Sigel E., Salzmann M. and Carafoli E. (1976) A kinetic study of the energy-linked influx of Ca<sup>2+</sup> into heart mitochondria. Eur. J. Biochem. 69, 429-434
7. Denton R. M. and Mc Cormack J. G. (1980) On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. FEBS Lett. 119, 1-8
8. Fabiato A. and Fabiato F. (1979) Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. J. Physiol. (Paris) 75, 463-505

9. Foster R., Lobo M. V., Rasmussen H. and Marusic E. T. (1981) Calcium: Its role in the mechanism of action of angiotensina II and potassium in aldosterone production. *Endocrinology* 109, 2196-2201
10. Gmaj P., Nowicka C. and Angielski S. (1974) Oligomycin-Insensitive ATPase And calcium transport in rat kidney cortex mitochondria. *FEBS Lett.* 47, 76-80
11. Gómez-Puyou A., Tuena de Gómez Puyou M., Klapp M. and Carafoli E. (1979) The efect of calcium on the translocation of adenine nucleotides in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 194, 384-399
12. Hall P. F., Osawa S. and Thomasson C. L. (1981) A role for calmodulin in the regulation of steroidogenesis. *J. Cell. Biol.* 90, 402-407
13. Janszen E. H. A., Cooke B. A., Von Driel M. J. A. and Van Der Molen H. J. (1976) The effect of calcium ions on testosterone production in Leydig Cells from rat testis. *Biochem J.* 160, 433-437
14. Johnston J. D. and Brand M. D. (1987) Stimulation of the respiration rate of rat liver mitochondria by submicromolar concentrations of extramitochondrial calcium. *Biochem. J.* 245, 217-222
15. Klimek J., Boguslawski W. and Zelewski L. (1979) The relationship between energy generation and cholesterol side-chain cleavage reaction in the mitochondria from human term placenta. *Biochimica et Biophysica Acta*, 587, 362-372

16. Koos R. D. and Hansel W. (1981) In dynamics of ovarian function. eds. Swarts N. B. and Hunsicker Dunn M. (Raven, New York), pp 197-203
17. Koritz S. B. and Péron F. G. (1959) The stimulation *in vitro* by  $Ca^{2+}$ , freezing and proteolysis of corticoid production by rat adrenal tissue. *J. Biol. Chem.* 234, 3122-312826.
18. Lehninger A. L., Vercesi A. and Bababunmi E. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1690-1694
19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
20. Martínez F., Chávez E. and Echegoyen S. (1987) Decreased exchange of adenine nucleotides in human placental mitochondria. *Int. J. Biochem.* 19, 275-279
21. Martínez F., Cheung S. W., Crane J. P. and Arias F. (1983) Use of trophoblast cells in tissue culture for fetal chromosomal studies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 147, 542-547
22. Mason J. I. and Boyd G. S. (1971) The cholesterol side-chain cleavage enzyme system in mitochondria of human term placenta. *Eur. J. Biochem.* 21, 308-321
23. Mc Intosh E. N., Uzgiriz V. I., Alonso C. and Salhanick H. A. (1971) Spectral properties, respiratory activity, and enzyme system of bovine corpus luteum mitochondria. *Biochemistry* 10, 2909-2916
24. Meigs R. A. and Ryan K. J. (1968) Cytochrome P-450 and steroid biosynthesis in the human placenta. *Biochim. Biophys. Acta* 165, 476-472

25. Menon K. M. J. and Jaffe R. B. (1973) Chorionic gonadotropin-sensitive adenylate cyclase in human term placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36, 1104-1109
26. Moreno-Sánchez R. (1985) Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free  $Ca^{2+}$  concentrations. *J. Biol. Chem.* 260, 4028-4034
27. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A. and Rodwell V. W. (1988) *Harper's Biochemistry*. Prentice-Hall.
28. Nicholls D. G. and Crompton M. (1980) Mitochondrial calcium transport. *FEBS Lett.* 111, 261-268.
29. Olivera A. A. and Meigs R. A. (1975) Mitochondria from human term placenta: I. Isolation and assay conditions for oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 376, 426-435
30. Olivera A. A. and Meigs R. A. (1975) Mitochondria from human term placenta: II. Characterization of respiratory pathways and coupling mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 376, 436-445
31. Péron F. G. and Koritz S. B. (1960) On the location of the stimulation *in vitro* by  $Ca^{2+}$  and freezing of corticoid production by rat adrenal homogenates. *J. Biol. Chem.* 235, 1625-1628
32. Robertson S. P., Potter J. D. and Rouslin W. (1982) The  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  dependence of  $Ca^{2+}$  uptake and respiratory function of porcine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257, 1743-1748

33. Robinson J. and Stevenson P. M. (1971) Electron flow and cholesterol-side chain cleavage in ovarian mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 24, 18-30
34. Sauer L. A. and Mulrow P. J. (1969) Steroid hydroxylations in rat adrenal mitochondria: I. Some properties of the C-18 and 11- $\beta$  Hydroxylations in tightly coupled mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 134, 486-496
35. Shemesh M., Hansel W. and Strauss III, J. F. (1984) Calcium-dependent, cyclic nucleotide-independent steroidogenesis in the bovine placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6403-6407
36. Shemesh M., Strauss III J. F., Hansel W., Shore L. S. and Izhar M. (1988) Control of bovine placental progesterone synthesis: Roles of cholesterol availability and calcium-activated systems. *J. Steroids Biochem.* 29, 21-25
37. Simpson E. R. and McDonald P. C. (1981) Physiology of the placenta. *A. Rev. Physiol.* 43, 163-168
38. Stone D, and Hechter O. (1954) Studies on ACTH action in perfused bovine adrenals: The site of action of ACTH in corticosteroidogenesis. *Arch, Biochem. Biophys.* 51, 457-469
39. Sumner J. B. (1944) A method of the colorimetric determination of phosphorus. *Science* 100, 413-414
40. Tsokos J., Corwell T. F. and Vlasuk G. (1980)  $Ca^{2+}$  efflux from liver mitochondria induced by a decrease in extramitochondrial pH. *FEBS Lett.* 119, 297-300

41. Vallières J., Scarpa A. and Somlyo A. P. (1975) Subcellular fractions on smooth muscle. Isolation, substrate utilization and  $Ca^{2+}$  transport by main pulmonary artery and mesenteric vein mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 170, 659-669
42. Veldhuis J. D. and Klase P. A. (1982) Calcium ions modulate hormonally stimulated progesterone production in isolated ovarian cells. Biochem. J. 203, 381-386
43. Vinogradov A., Scarpa A. and Chance B. (1972) Calcium and pyridine nucleotide interaction in mitochondrial membranes. Arch. Biochem. Biophys. 152, 646-654