

91

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

CAMPUS IZTACALA



“PARTICIPACION DE LOS GRUPOS TIOLES EN LA
REGULACION DE LA TRANSICION DE LA
PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL”

T E S I S

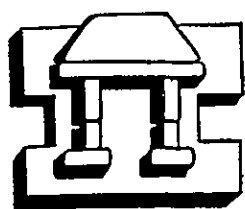
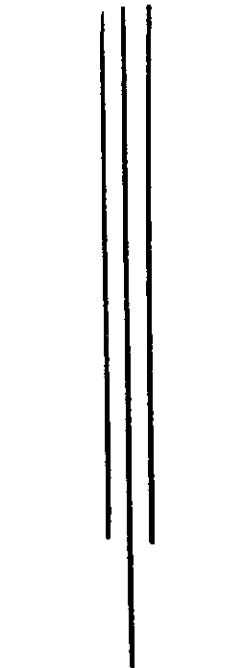
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

SANCHEZ CORTES CESAR ALEJANDRO

2827



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, MEXICO.

2000



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.

La presente Tesis de Licenciatura se realizó bajo la dirección de la M. en C. Ana Cecilia Zazueta Mendizabal en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Rafael Moreno Sánchez

Dr. Sergio González

M. en C. Ana Cecilia Zazueta Mendizabal

Dr. Ignacio Peñalosa

Biol. Hugo Perales

El presente trabajo lo dedico:

A mis padres, por su sacrificio incondicional. Gracias.

A mis hermanos por su apoyo y paciencia.

A la Dra. Cecilia Zazueta por sus enseñanzas, exigencia, comprensión y amistad.

A la biósfera y compañeros de grupo con quienes aprendí de la vida académica.

A Verónica Luna y Diana Monroy por su trabajo y ánimo para alcanzar esta meta.

A mi nena, mi sobrina.

Agradezco la ayuda de Raúl Covián para la elaboración de algunos gráficos.

...donde la relatividad es evidencia de que los avances científicos pretenden ser relevantes en su tiempo y desde un enfoque. (Acoplado de Einstein)

...la percepción y la capacidad tecnológica nos alcanza para evidenciar fenómenos que después podrán ser revocados por nuevos descubrimientos.

La naturaleza es, aunque no comprendamos su esencia o funcionamiento: saber.

Stalin.

ABREVIATURAS

$\Delta\Psi$	Potencial transmembranal
AdNT	Translocador de adenín nucleótidos
ADP	Adenosín difosfato
AsO	Anión Arsenito
ATP	Adenosín trifosfato
CAT	Carboxiatractilósido
CHAPS	(3-(3-colamidopropil) Dimetil-amonio-propano sulfonato)
CSA	Ciclosporina A
DTNB	Ácido 5,5'-Ditio-bis(2-nitobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Etilenglicol-bis(β -aminoetil éter), ácido N,N,N',N'-tetraacético
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenil hidrazona
GSSG/GSH	Glutation oxidado y reducido
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HS ⁻ SH	Enlace ditiol
MMC	Megacanal Mitocondrial
NEM	N-etilmaleimida
Pi	Fosfato
PTP	Poros de la Transición de la Permeabilidad Mitocondrial
R.R.	Rojo de Rutenio
ROS	Radicales libres derivados de oxígeno
S ⁻ S	Enlace disulfuro
SH	Tiol o sulfhidrilo
TPM	Transición de la Permeabilidad Mitocondrial
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol (Buffer)
VDAC	Canal Aniónico de la membrana Dependiente de Voltaje

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

Mecanismos de Transporte de Calcio	1
Uniportador de Ca^{2+}	3
Intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$	4
Intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$	5
Transición de la Permeabilidad Mitocondrial (TPM)	5
Modulación de la Transición de la Permeabilidad Mitocondrial	7
Medición de la Transición de la Permeabilidad	8
Modelos de la Transición de la Permeabilidad	9
Modelo de Hunter	11
Modelo de Griffiths y Halestrap	12
Modelo de Mc Enery	13
Participación de los Grupos Tioles en la Transición de la Permeabilidad	14
Cadmio como Inductor de la TPM	16
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	18
METODOLOGÍA	
Obtención de mitocondrias de riñón de rata	19
Medios de Incubación	19
Inducción de la TPM por Cd^{2+}	20
Liberación de calcio inducida por Cd^{2+}	20

Efecto de la NEM y CSA sobre la liberación de Ca^{2+} inducida por Cd^{2+}	20
Cuantificación de grupos tioles	21
Cuantificación de cadmio unido en proteínas mitocondriales	21
Efecto del DTT sobre: el Potencial de Membrana y liberación de Ca^{2+} en mitocondrias expuestas a Cd^{2+}	22
Efecto del DTT sobre la unión de Cd^{2+} en proteínas mitocondriales	22
Análisis de las proteínas que unen $^{109}\text{Cd}^{2+}$: autoradiografía y electroelución	23
Solubilización de proteínas mitocondriales	23
Purificación de proteínas que contienen grupos tioles sensibles a Cd^{2+}	24
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	51

INTRODUCCIÓN

Las células presentan una compartimentalización que delimita la distribución de los procesos celulares en organelos, simplificando y acelerando la función celular en general (Arinze y Hanson, 1980).

Las mitocondrias son compartimentos intracelulares de los tejidos con metabolismo aeróbico. Estos organelos tienen una longitud aproximada de 1.5 a 2 μm y un diámetro de 0.5 a 1 μm . Las mitocondrias están delimitadas por una membrana doble, es decir, dos membranas unitarias separadas por un espacio intermembranal; mientras la membrana externa es lisa y continua alrededor de la mitocondria, la interna forma extensos plegamientos irregulares (crestas); el aspecto de las crestas puede ser diferente según el tejido del que procedan e incluso del medio en que se encuentran suspendidas. El interior del organelo, lleno de líquido, recibe el nombre de matriz mitocondrial (Whittaker, 1978). En las mitocondrias se desarrollan funciones celulares muy importantes como la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones de la cadena respiratoria (Voet y Voet, 1995).

MECANISMOS DE TRANSPORTE DE CALCIO MITOCONDRIAL

Hasta hace algunos años se consideraba que las mitocondrias acumulaban Ca^{2+} , para amortiguar o reducir la concentración de Ca^{2+} citosólico en respuesta a las variaciones de este ion dentro de la célula (Akerman y Nicholls, 1983). Actualmente se sabe que el calcio modula la actividad de algunas enzimas intramitocondriales como la

isocitrato deshidrogenasa, la α -cetoglutarato deshidrogenasa (participantes en el ciclo de Krebs), y la piruvato deshidrogenasa (Denton y McCormack, 1990; Hansford, 1994).

Durante las últimas dos décadas se han obtenido evidencias de que el Ca^{2+} juega un papel importante en la regulación de numerosas funciones celulares, así como en el metabolismo energético, por lo que resulta evidente la importancia que los sistemas de transporte de Ca^{2+} mitocondrial juegan para amortiguar los cambios de concentración de Ca^{2+} citosólico hacia la matriz mitocondrial y regular algunas actividades bioquímicas mitocondriales (Shey-Shing y Mei-Jie, 1994).

La selectividad en el transporte de Ca^{2+} se desarrolla en la membrana interna de la mitocondria, ya que la membrana externa posee proteínas que actúan como poros no específicos para solutos de peso molecular de hasta 10 kDa (Zalman et al., 1980); por su parte, la membrana interna presenta una permeabilidad específica en la cual el intercambio de iones se lleva a cabo mediante acarreadores inmersos en la membrana (Gunter y Pfeiffer, 1990).

La acumulación de calcio es un fenómeno dependiente de energía, ya sea por la oxidación de un sustrato a través de la cadena respiratoria o por la hidrólisis de ATP; lo que genera un potencial de membrana interno negativo (entre 140 y 180 mV) que favorece la entrada de Ca^{2+} (Carafoli, 1975, Akerman y Nicholls, 1983). La capacidad mitocondrial para acumular calcio dentro de la matriz puede exceder 1 μmol por miligramo de proteína y la afinidad para captarlo es suficiente para reducir la concentración de calcio libre externo a 1 μM ó menos.

Existen evidencias de la existencia de cuatro mecanismos de transporte de Ca^{2+} en la membrana interna mitocondrial de los vertebrados. El primero es la entrada de calcio a

través de un uniportador; los dos siguientes implican el mecanismo de salida, tanto dependiente de Na^+ , como independiente de este catión. Y el último se relaciona con un dramático incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Gunter y Pfeiffer, 1990, Gunter y Gunter, 1994), que lleva a la salida de Ca^{2+} entre otros solutos.

La captación de Ca^{2+} por la mitocondria, se ha descrito como un “proceso activo secundario” ya que la acumulación se inicia después de un gasto de energía metabólica de la mitocondria para mantener el potencial de membrana que induce la entrada de calcio (Gunter y Pfeiffer, 1990). El término de “transporte activo primario” describe la situación en que la energía metabólica producida a partir de la hidrólisis de ATP está acoplada directamente al flujo del transportador (Op. cit).

La concentración del Ca^{2+} dentro de la matriz mitocondrial es menor que en el espacio externo, por lo que el flujo de entrada es energéticamente favorable, mientras que su salida requiere de energía. El uniportador (U) de Ca^{2+} mitocondrial facilita el transporte de Ca^{2+} hacia el interior a favor del gradiente electroquímico de este ion. El mecanismo de salida independiente de Na^+ (I) actúa como un intercambiador activo de $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$, usando el gradiente químico de H^+ como fuerza impulsora. El mecanismo de salida dependiente de Na^+ (D) actúa como intercambiador con una estequiometría $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$; aunque se ha propuesto que la relación pueda ser 1:3 (Gunter, 1994) (Fig.1).

Uniportador de Ca^{2+}

El uniportador permite la entrada electroforética de calcio en respuesta al establecimiento del potencial de membrana, sostenido por la oxidación de un sustrato o

por la hidrólisis del ATP. Bajo ciertas condiciones puede actuar en reversa, es decir, lo hace bidireccionalmente.

Tiene una baja afinidad por el calcio (K_m , 1-10 μ M). Por esta vía el Ca^{2+} se acumula a una velocidad de 10 nmol/mg de proteína \cdot seg $^{-1}$ (Carafoli,1988). El uniportador es inhibido por rojo de rutenio (K_i , 30nM), por la serie de lantánidos (Reed y Bygrave,1974) y por otros compuestos polinucleares (Tashmukhamedov et al.,1972, Ying et al.,1991).

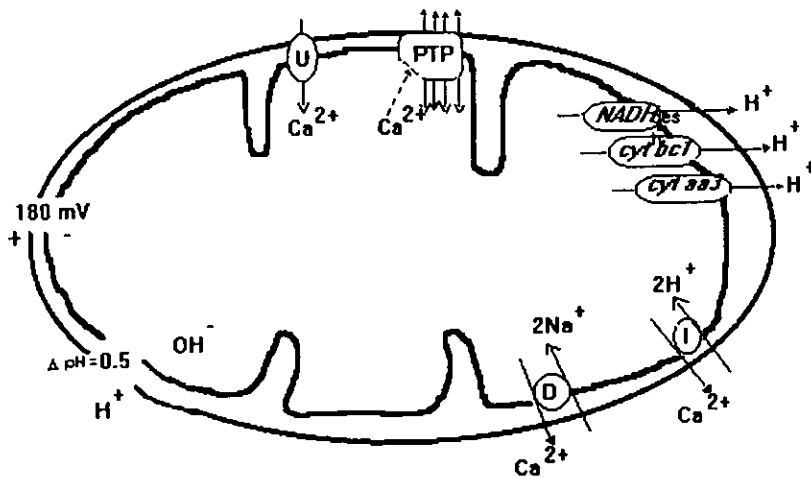


Fig.1 Mecanismos de transporte de Ca^{2+} mitocondrial. Tomado de Gunter y Gunter,1994.

Intercambiador Ca^{2+}/Na^+

El intercambio Ca^{2+}/Na^+ es un mecanismo de salida de Ca^{2+} activo, con una estequiometría 1:2, aunque existe controversia si esta relación es diferente (1:3) (Gunter y Gunter,1994). Wingrove y Gunter (1986) determinaron los valores de V_{max} , $K_{m_{Na}}$, y $K_{m_{Ca}}$ en mitocondrias de hígado: 2.6 nmol/mg.min, 9.4 mM, y 8.1 mM, respectivamente;este mecanismo es mucho más activo en mitocondrias de tejidos excitables, por ejemplo, corazón y cerebro. La salida de Ca^{2+} a través de este

intercambiador, es activada por espermina y espermidina (Nicchita y Williamson, 1984); es inhibida por Mg^{2+} , por altas concentraciones de rojo de rutenio (Wingrove y Gunter, 1986) y por verapamil (Wolkowicz et al., 1983).

Intercambiador H^+/Ca^{2+}

Este intercambiador activo permite la salida de Ca^{2+} por dos protones que entran a la mitocondria, recibiendo parte de su energía de la cadena de transporte de electrones (Gunter et al., 1991). Este mecanismo es completamente independiente de Na^+ (Bernardi y Azzone, 1979, Gunter y Pfeiffer, 1990). Los parámetros cinéticos más altos reportados para este mecanismo son $V_{max} = 1.2 \text{ nmol/mg}\cdot\text{min}^{-1}$, $K_m = 8.4 \text{ nmol/mg}$ (Wingrove y Gunter, 1986), en mitocondrias de hígado. La salida se inhibe con bajas concentraciones de desacoplantes (Bernardi y Azzone, 1982, Gunter, 1990); el Sr^{2+} (Gunter et al., 1988) y el Mn^{2+} (Gavin et al., 1990) lo inhiben competitivamente pues son transportados por este mecanismo.

Transición de la Permeabilidad Mitocondrial

Además de los transportadores específicos mencionados, existe un cuarto mecanismo de transporte, en que la permeabilidad de la membrana cambia y se hace inespecífica (Hunter et al., 1976), permitiendo el paso de diversos iones y moléculas de hasta 2.8 nm de diámetro (Massari y Azzone, 1972), correspondientes a solutos con una masa molecular de alrededor de 1.5 kDa (Bernardi et al., 1994); aunque Igbavboa et al. (1989) y Chávez et al. (1992), reportaron la salida de moléculas mayores. Este dramático incremento en la permeabilidad ocurre después de la acumulación masiva de calcio y

puede inducirse mediante una amplia variedad de agentes (Zoratti y Szabó, 1995). Así la transición de la permeabilidad mitocondrial es considerada como una forma de transporte de Ca^{2+} . Se ha sugerido que opera en condiciones patológicas (Gunter y Pfeiffer, 1990, Richter, 1993), en la muerte celular programada o apoptosis (Kroemer et al., 1997, Qian et al., 1997) y recientemente se ha propuesto que puede funcionar también bajo condiciones fisiológicas (Ichas y Mazat, 1998).

El mecanismo mediante el cual la membrana pierde su impermeabilidad, no se ha definido con precisión, sin embargo se han propuesto dos hipótesis: Beatrice et al. (1984) propusieron que el daño en la fase lipídica de la membrana se debía a la acumulación de lisofosfolípidos y ácidos grasos de la membrana productos de la actividad de la fosfolipasa A_2 dependiente de Ca^{2+} y a la inhibición de una acil-CoA aciltransferasa. Por otra parte, Hunter y Haworth en 1979, postularon que la permeabilidad inespecífica es causada por un poro proteínico transmembranal y que los inhibidores y activadores de la transición se unen a sitios específicos del poro afectando la apertura o cierre de forma alostérica. El consenso actual es que la permeabilización de la mitocondria se debe a la operación de este poro proteínico. La hipótesis del daño a la fase lipídica de la membrana también ha recibido apoyo; sin embargo, las siguientes observaciones la descartan: la ciclosporina A (CSA) previene y revierte con muy alta afinidad (2 nM) la transición de la permeabilidad en mitocondrias aisladas (Broekemeier et al., 1989). Al-Nasser y Crompton (1986), argumentan que la reaclilación de los lípidos de la membrana sería imposible debido a que durante la transición se pierden pequeños solutos, incluyendo ADP y coenzima A que son necesarios para dicha reaclilación; en 1988, Crompton y Crosti demuestran que el tiempo medio de restauración (1-8 seg) al aplicar CSA, es demasiado rápido para permitir la

recilación de los lípidos; por lo que descartan el modelo de degradación de lípidos membranales.

Las condiciones para que se presente el fenómeno de la transición son: una acumulación masiva de Ca^{2+} hasta concentraciones suprafisiológicas (Hunter et al.,1976, Chávez y Holguín,1988, Petronilli et al.,1994), y la presencia de un agente inductor que puede acelerar el fenómeno (Zoratti y Szabó,1995). Este proceso se acompaña por un colapso del potencial de membrana, hinchamiento y salida de solutos de la matriz (Chávez y Holguín,1988, Crompton et al.,1988, Igbavboa et al.,1989, y Petronilli et al.,1993).

Modulación de la Transición de la Permeabilidad.

Dentro de los diferentes tipos de inductores se pueden destacar: el fosfato; agentes oxidantes (de piridín nucleótidos); agentes que reaccionan con grupos tioles (Cu^{2+} , Cd^{2+}); entrecruzadores y formadores de puentes disulfuro (óxido de fenilarsina, Cu/orto-fenantrolina); ligandos del translocador de adenín nucleótidos y agentes desacoplantes (Zoratti y Szabó,1995).

Entre los inhibidores que contrarrestan o previenen la inducción del fenómeno están los adenín nucleótidos (ADP,ATP), así como otros ligandos del translocador de adenín nucleótidos (bongkretato); el Mg^{2+} y el Sr^{2+} ; agentes reductores de grupos tioles (Ditiotreitol-DTT); agentes reactivos de grupos monotioles (NEM); y albúmina sérica de bovino (Gunter y Pfeiffer, 1990, Zoratti y Szabó,1995). El inmunosupresor ciclosporina A (CSA) (fig. 2) es el inhibidor más potente del poro de la transición de la permeabilidad (PTP), que al parecer actúa mediante su unión a una ciclofilina mitocondrial (Griffiths y Halestrap, 1990).

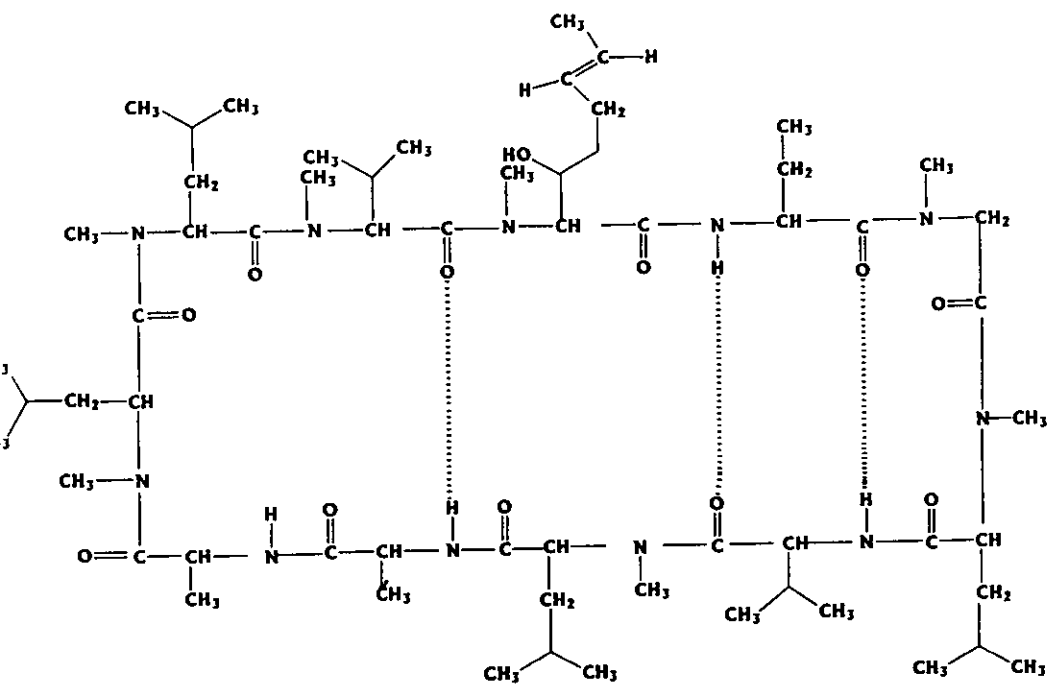


Fig.2 Estructura del inmunosupresor Ciclosporina A (CSA).

Tomado de Wenger (1989)

Medición de la Transición de la Permeabilidad

Las técnicas para determinar el fenómeno de la transición de la permeabilidad son muy variadas, entre ellas se encuentran: a) cuantificación del hinchamiento en

mitocondrias aisladas (Bernardi et al.,1992., Lapidus y Sokolove,1994; Zoratti y Szabó,1995); b) medición del potencial de membrana (Chávez et al.,1985); c) determinación de la salida o acumulación de Ca^{2+} , mediante indicadores metalocrómicos específicos o por fluorescencia (Vercesi,1984., Chávez y Holguín,1988., Chávez et al.,1997); d) técnica de atrapamiento de sacarosa y el cierre posterior con EGTA, donde pueden realizarse experimentos de cinética (Al-Nasser y Crompton,1986, Crompton y Costi,1988, Zoratti y Szabó, 1995); e) la técnica de "patch clamp", con la que se puede medir el PTP a nivel de un sólo canal (Kinally et al.,1992); f) la utilización de compuestos marcados (inhibidores o inductores), que se unan específicamente al componente estructural o a la entidad molecular responsable de la regulación (Chávez y Holguín,1988, Le Quoc y Le Quoc,1988, Zazueta et al.,1998).

Modelos del Poro de la Transición de la Permeabilidad

Basados principalmente en los efectos de los inductores e inhibidores, y según las técnicas establecidas para la medición del fenómeno, se han propuesto diferentes modelos para establecer la identidad del poro. Uno de los más populares involucra al translocador de adenín nucleótidos (AdNT) (Hunter y Haworth,1980. Panov et al.,1980); en este modelo se relaciona el efecto de los ligandos del AdNT (ácido bonkrékico, carboxiatractilósido, así como ADP) sobre la apertura del poro de la permeabilidad mitocondrial (Fig.3). LeQuoc y LeQuoc (1988), analizando el efecto de estos inhibidores concluyeron que el estado conformacional "c" (citósólico) del translocador favorece la permeabilidad de la membrana.

Griffiths y Halestrap (1991) propusieron un modelo similar, en el cual el translocador adopta la conformación de poro, después de la unión de Ca^{2+} y de una ciclofilina mitocondrial, enzima que actúa como peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa, ambos se unen al translocador permitiendo la conversión del acarreador en un poro inespecífico. La unión de estos dos compuestos, del lado de la matriz, ocurre exclusivamente en el estado conformacional citosólico del acarreador. La unión de la ciclofilina se inhibe por CsA, evitándose la formación del poro (Fig.4). Estas observaciones apoyan la participación del AdNT, sin embargo modifican ligeramente el modelo de Hunter y Haworth, ya que ellos proponen que el poro puede formarse sólo si la CSA es "secuestrada" por la ciclofilina y no por su participación al unirse al acarreador.

Otro modelo es el de Mc Enery (1992), quien sugirió que la porina (proteína de la membrana externa mitocondrial), junto con otras proteínas forman un complejo conocido como Canal Aniónico de la membrana interna Dependiente de Voltaje (VDAC). Sugiere que se puede formar un complejo supramolecular involucrando al VDAC, al AdNT y a dos proteínas de 18 kDa, formando así un megacanal mitocondrial (MMC), al que se atribuye el papel de PTP (Fig.5).

Algunos autores proponen que puede existir una fusión transitoria (a manera de "gap junction") entre una proteína de la membrana interna y la membrana externa mitocondriales y la responsabilizan del PTP (Hunter y Haworth, 1980).

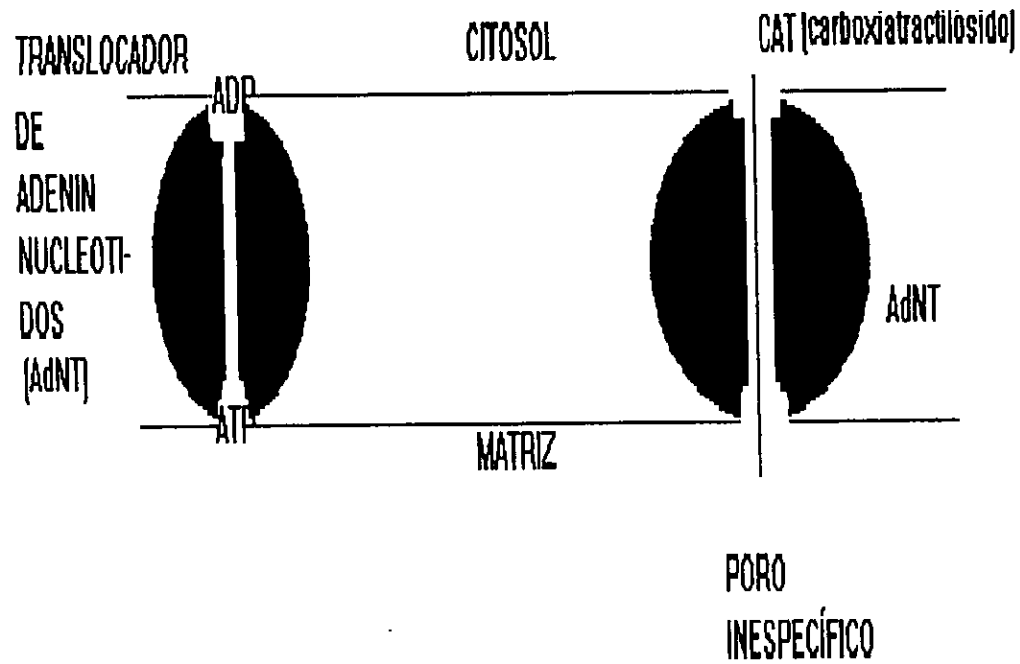


Fig 3 Modelo de Hunter. El translocador de adenín nucleótidos conforma el PTP.

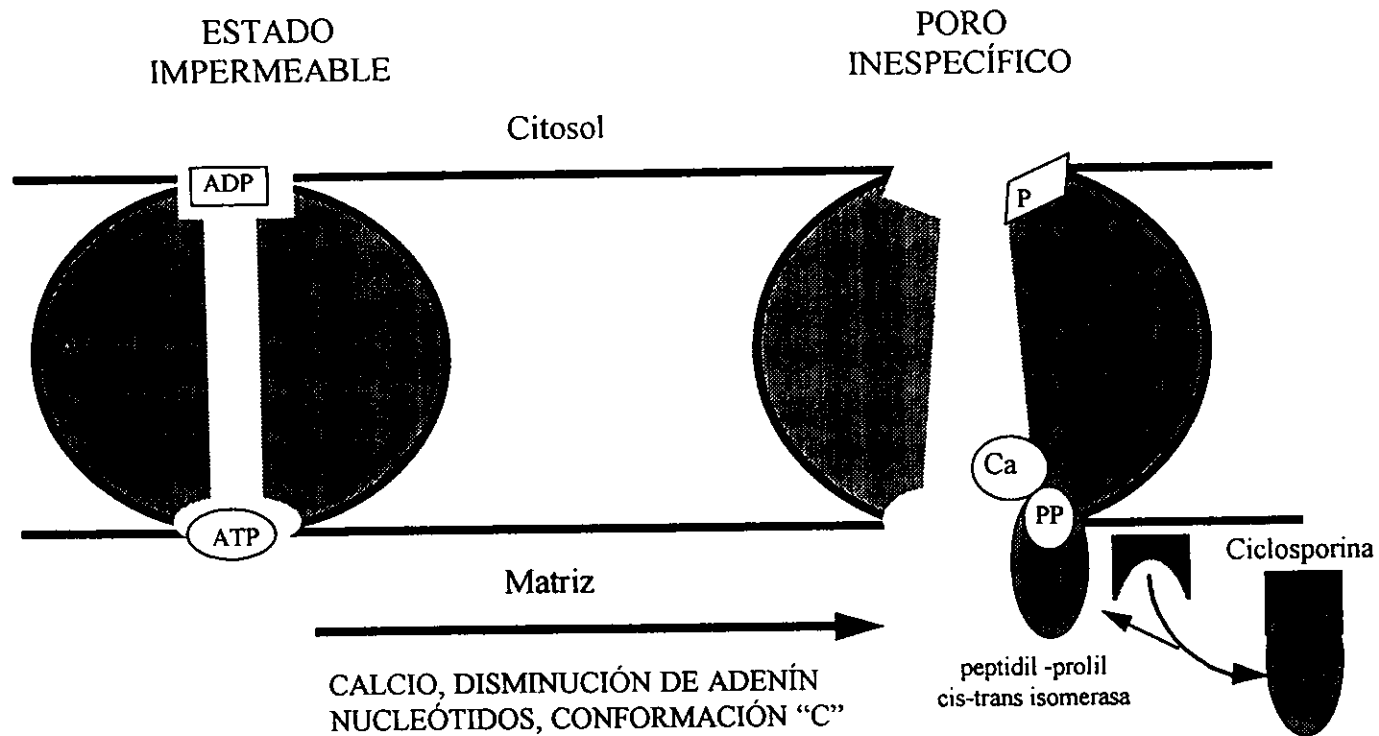
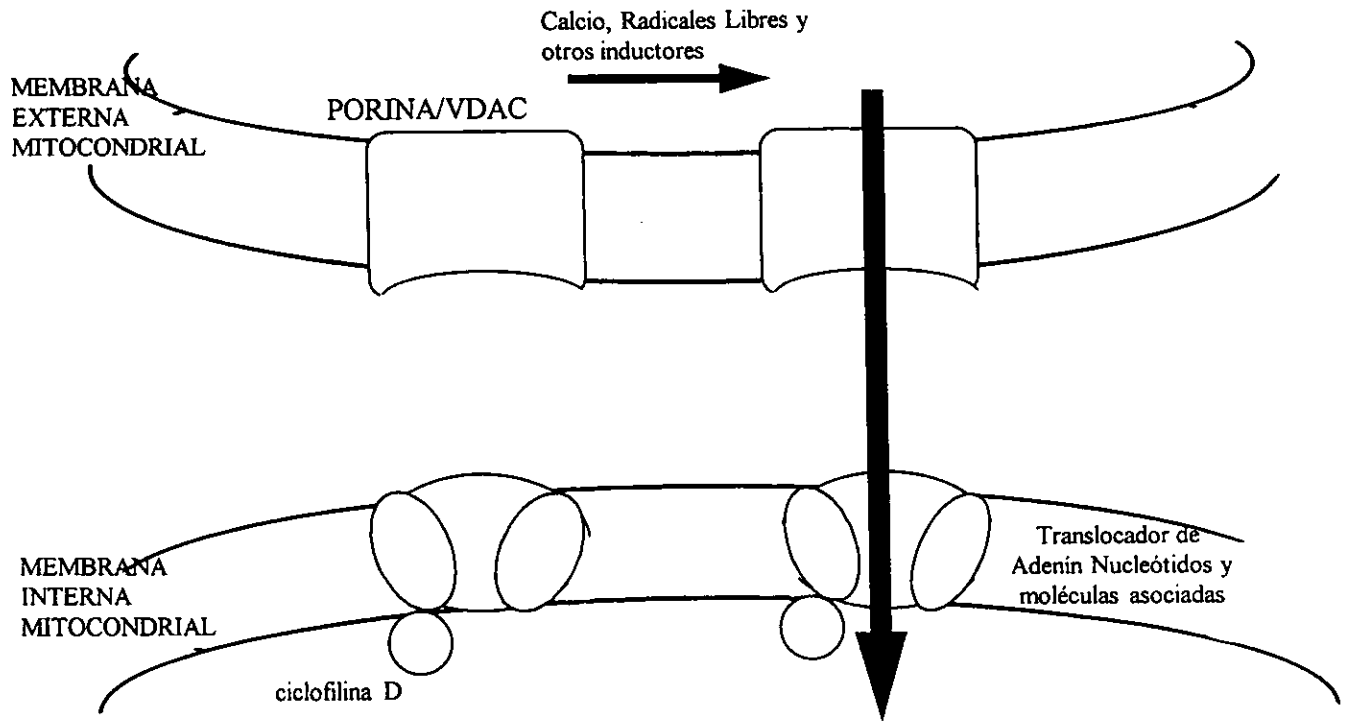


Fig.4 Modelo de Halestrap. El translocador de adenín nucleótidos conforma el PTP.



- *Disipación del Potencial de Membrana
- *Hinchamiento
- *Salida de una gran cantidad de Solutos (entre ellos calcio)

Fig.5 Modelo de Mc Eneary. El responsable de la función del PTP es el Megacanal Mitocondrial. Tomado de Green y Reed (1998)

Dentro de los modelos propuestos hay que tener consideraciones acerca de las formas de regulación, las cuales pueden ayudar a aclarar la controversial identidad del poro. Algunos eventos claves para la regulación son:

- i) despolarización de la membrana (pérdida del potencial fisiológico ~ 180 mV);
- ii) pH de la matriz (~ 7.3 se favorece su abertura y a pH inferior a 7 se cierra) (Nicolli et al., 1993);
- iii) cationes divalentes que actúan en al menos dos sitios diferentes, uno externo que si se ocupa por cualquier Me^{2+} , incluyendo el Ca^{2+} , disminuye la posibilidad de abertura del poro; y un sitio interno cuya ocupación por Ca^{2+} incrementa la probabilidad de abertura, pero la pegada de otros cationes divalentes (como Sr^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}) lo cierran (Bernardi et al., 1992, Bernardi y Petronilli, 1996);
- iv) la oxidación de un tiol específico que incrementa la posibilidad de abertura, dentro de los valores fisiológicos del potencial de membrana. Es la interconversión ditiol-disulfuro ($HS-SH \rightarrow S-S$) de cisteínas vecinas, quienes afectan los estados de abertura y cierre, asociándose una mayor posibilidad de abertura con la forma oxidada ($S-S$) (Le Quoc y Le Quoc, 1985, Bernardi et al., 1994).

Participación de los grupos tioles en la regulación de la Transición de la Permeabilidad Mitochondrial.

En este contexto existen diversas hipótesis respecto a la participación de los grupos tioles. Hay evidencias de que el estado de oxidación del par redox $NADH/NAD^+$ de la matriz puede sensibilizar la abertura del poro en presencia de Ca^{2+} , que probablemente afecte el estado de los tioles de las proteínas (Hunter y Haworth, 1979).

En 1984, Vercesi propuso que la acumulación de GSSG (glutacion oxidado), asociado con la modificación de los piridin nucleótidos mitocondriales, podría repercutir en la oxidación de grupos tioles criticos de proteínas membranales involucrados en el mantenimiento de la integridad de la membrana.

En 1992, Zwinsky y Schmid reportaron que bajo condiciones de stress oxidativo, el AdNT se modifica y Dierks et al. (1990) mencionaron que esta proteína tiene algunos grupos tioles reactivos cuya modificación en el acarreador reconstituido, puede inducir propiedades semejantes a las de un canal.

Dentro de esta alternativa, Bernardi (1994) considera que la regulación de estos tioles es sobre un sensor de voltaje, que a su vez puede ser regulado por muchos efectores; sugieren la existencia de un potencial de abertura sensible a voltaje: a un nivel de bajo potencial por la reducción o sustitución de los -SH, el poro se mantiene cerrado; mientras que se alcanza un alto potencial por la oxidación o formación de complejos por parte de los grupos tioles (S-As-S, o S-S), y esto se traduce en la abertura del poro; por ello atribuyen mayor importancia al sensor de voltaje que al potencial de membrana *per se* (Gunter y Pfeiffer, 1990, Bernardi et al., 1992, Petronilli et al., 1993, Petronilli et al., 1994, Zoratti y Szabó, 1995, Bernardi y Petronilli, 1996, Costantini et al, 1996).

Por su parte Chernyak y Bernardi (1996) proponen que bajo condiciones oxidativas, se distinguen dos sitios de regulación del PTP, en respuesta a esa oxidación; uno ligado a un ditiol crítico y el otro ligado a los piridin nucleótidos. Dependiendo de la oxidación del glutacion o bien de los piridin nucleótidos (tal vez NADH), se incrementará la aparente sensibilidad a Ca^{2+} del PTP, debiendo estar el otro componente en estado reducido , para que ese sitio sea el control.

Participación de los grupos tioles en la Transición de la Permeabilidad Mitocondrial.

Macedo et al. (1988) mencionan que hay un reingreso de Ca^{2+} a las mitocondrias inmediatamente después de la adición de dithiotreitol (DTT) que regenera los tioles membranales.

Petronilli et al. (1994) demostraron que bajas concentraciones ($20\mu\text{M}$) del reactivo monofuncional para grupos tioles NEM (N-etilmaleimida) no inducen la transición del poro *per se* y que el DTT (Dithiotreitol) inhibe y revierte la apertura causada por menadiona, diamida, arsenito y TBH (tert-butilhidroperóxido).

En 1988 Chávez y Holguín reiteraron la participación de grupos tioles al inducir la salida de Ca^{2+} con $5\mu\text{M}$ de Hg^{2+} (con una afinidad de 6 nmol/mg de proteína), y propusieron que el sitio responsable de la liberación de Ca^{2+} inducida por Hg^{2+} se localiza en el lado externo de la membrana interna mitocondrial. Demostraron que la modificación de aproximadamente 1 nmol de $-\text{SH/mg}$ de proteína es suficiente para promover cambios en la permeabilidad membranal mitocondrial y que pueden atribuirse principalmente a proteínas de entre 30 y 50 kDa .

Estudios con Cd^{2+} como inductor de la transición de la permeabilidad.

Se sabe que el cadmio es un inductor de la transición de la permeabilidad mitocondrial (Sanadi et al., 1981, Rasheed et al., 1984). Estos últimos autores observaron hinchamiento mitocondrial con Cd^{2+} ($1-5\mu\text{M}$) en mitocondrias de hígado de rata; sus resultados sugieren que este catión actúa sobre dos tipos de grupos tioles, uno de ellos induce la entrada de K^+ provocando el hinchamiento, y el otro provoca la salida de Ca^{2+} .

Chávez y colaboradores (1985) reportaron que el Cd^{2+} induce la liberación de calcio intramitocondrial, y que inhibe competitivamente al uniportador de calcio, esto es, que la vía de acceso del Cd^{2+} a la mitocondria es a través de dicho transportador. También que una concentración de 5 a 40 μM de CdCl_2 incrementa la hidrólisis de ATP y que 100 μM de ese mismo ion induce el colapso del potencial de membrana. Correlacionaron los efectos de liberación de Ca^{2+} , con el abatimiento del potencial membranal; demostraron que la acción de este catión divalente sobre el transporte de Ca^{2+} es debido a la modificación de grupos -SH vecinos, al revertir completamente la salida de calcio utilizando el agente reductor ditioneitol (DTT).

Los objetivos que proponemos son para tratar de identificar al componente membranal que contiene los grupos tioles críticos que regulan la transición de la permeabilidad mitocondrial, utilizando Cd^{2+} como agente inductor.

OBJETIVOS

Inducir la transición de la permeabilidad mitocondrial con Cd^{2+} a concentraciones menores que las reportadas, utilizando simultáneamente el reactivo monofuncional NEM.

Identificar a la proteína en cuyos grupos tioles se desarrollan las transiciones redox, y que están asociados a los cambios de la permeabilidad de la membrana utilizando $^{109}\text{Cd}^{2+}$.

Aislar la proteína que une Cd^{2+} por medio de técnicas de electroelución y por cromatografía de afinidad.

HIPÓTESIS

La transición de la permeabilidad mitocondrial está mediada por un poro proteínico, cuya abertura es favorecida por la modificación de grupos tioles de la membrana interna, por lo tanto si utilizamos $^{109}\text{Cd}^{2+}$ como agente inductor, podremos identificar a la proteína que estructuralmente forma el poro, o al sitio que lo regula.

METODOLOGÍA

OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS.

Se aislaron mitocondrias de riñones de ratas hembras Wistar ($\approx 250\text{g}$), mediante la técnica de centrifugación diferencial, desarrollada por Schneider y Hogeboom en 1948; previa homogeneización del tejido, en un medio isotónico de Sacarosa 0.25M; EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.001M y TRIS 0.01M (pH 7.3). La primera centrifugación se realizó a baja velocidad (2500 rpm) durante 10 min; el sobrenadante se sometió a una nueva centrifugación por 10 min a 10 000 rpm. El sedimento se resuspendió y se incubó por 10 min en Sacarosa 0.25 M, TRIS 0.01 M y Albúmina sérica de bovino libre de ácidos grasos 0.1%. Se efectuó una centrifugación más a 10 000 rpm durante 10 min para lavar las mitocondrias y se resuspendieron en el mismo medio sin albúmina. Se realizó la determinación de proteínas por el método de Biuret (Gornall et al., 1949); utilizando un estándar de albúmina de bovino 10 mg/ml. La concentración de proteínas fluctuó entre 30 y 40 mg/ml.

CONDICIONES DE INCUBACIÓN PARA LOS EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE.

Se empleó en la mayoría de experimentos el siguiente medio: Sacarosa 0.25 M, succinato 0.01 M, HEPES 0.01 M, Pi 0.002 M, ADP 200 μM y rotenona 10 μg , en un

volumen final de 3ml, pH 7.3 (20°C). *Las adiciones y modificaciones a este medio estandarizado, se establecerán en la metodología específica.

INDUCCIÓN DE LA TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD POR Cd²⁺.

El fenómeno se indujo con diferentes concentraciones de CdCl₂ (3-10µM). El incremento en la permeabilidad mitocondrial se evaluó midiendo la cantidad de Ca²⁺ liberado de la matriz mitocondrial, utilizando un espectrofotómetro de doble haz SLM.AMINCO a una longitud de onda de 675-685 nm en presencia del colorante metalocrómico Arsenazo III (50µM). Las condiciones de incubación fueron las estandarizadas.

EFEECTO DEL Cd²⁺ SOBRE LA LIBERACIÓN DE Cd²⁺ EN MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA.

La salida de calcio se midió con la técnica de filtración utilizando 50 µM de ⁴⁵Ca²⁺ (actividad específica 1000 cpm/nmol). El diámetro de poro de los filtros fue de 0.45 µm. Las adiciones se realizaron de la siguiente forma: 0 min-2 mg de proteína; 4 min- 5 µM de CdCl₂; el filtrado se realizó al minuto 8.

EFEECTO DE LA N-ETILMALEIMIDA (NEM) SOBRE LA LIBERACIÓN DE Ca²⁺ INDUCIDA POR Cd²⁺.

Se cuantificó la salida de ⁴⁵Ca²⁺, respetando los tiempos relativos del ensayo anterior, pero permitiendo 6 min de incubación de la proteína en presencia de diferentes concentraciones de NEM (50, 75, 100 y 200 µM). Se empleó Cd²⁺ 5 µM.

EFECTO DE LA CSA SOBRE LA LIBERACIÓN DE Ca^{2+} INDUCIDA POR Cd^{2+} .

Se incubaron 2 mg de mitocondrias con diferentes concentraciones de CSA (0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 y 4.0 μ M) y se registró la salida de calcio espectrofotométricamente a 675-685nm. El medio de ensayo fue el estandarizado al cual se añadieron 50 μ M de Ca^{2+} .

CUANTIFICACION DE LOS GRUPOS TIOLES QUE UNEN Cd^{2+} EN PRESENCIA DE NEM.

2 mg de mitocondrias de riñón de rata se incubaron en un medio KCl-HEPES 1mM (pH 7.3-8), en presencia de diferentes concentraciones de NEM (0, 10, 20, 40, 50, 100 y 200 μ M); y se midieron los grupos tioles libres con el reactivo para grupos sulfhidrilo DTNB (200 η mol). La curva de titulación se realizó con cisteína 1mM (para obtener un rango de 10 a 130 η mol). Realizando el mismo procedimiento se cuantificaron los tioles en proteínas solubilizadas con CHAPS 1%.

CUANTIFICACIÓN DE Ca^{2+} UNIDO EN PROTEÍNAS MITOCONDRIALES.

Se adicionaron 2 mg de proteína al medio estandarizado. A los 4 min se agregaron diferentes concentraciones de $^{109}Cd^{2+}$ (1, 2, 3, 5, 7, 9 y 20 nmol/mg); al minuto 8 se centrifugaron las muestras. Se lavaron con el mismo medio y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min, dos veces más. Se midió la radioactividad en el precipitado.

EFECTO DEL DTT SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA EN MITOCONDRIAS EXPUESITAS A Cd²⁺.

El potencial de membrana se midió en un espectrofotómetro de doble haz a 533-511 nm. Las adiciones se realizaron de la siguiente manera: 1) 2 mg de proteína; 2) 5 µM de Cd²⁺; 3) 0.166 µM de rojo de rutenio; 4) DTT (50, 75 y 100 µM); 5) 10 µM de CCP. El medio de ensayo fue el estandar al que se añadieron 10 µM de safranina.

EFECTO DEL AGENTE REDUCTOR DTT SOBRE LA LIBERACIÓN DE ⁴⁵Cd²⁺ INDUCIDA POR Cd²⁺ EN MITOCONDRIAS.

La salida de Ca²⁺ se midió con la técnica de filtración empleando 50 µM de ⁴⁵Ca²⁺ (actividad específica 1000 cpm/nmol); el medio de ensayo fue el estandarizado y las concentraciones de DTT fueron de 12.5, 25, 50, 75 y 100 µM.

EFECTO DEL DTT SOBRE LA PEGADA DE Cd²⁺ EN PROTEÍNAS MITOCONDRIALES.

Se cuantificó la cantidad de ¹⁰⁹Cd²⁺ (3 y 5 µM) unido a mitocondrias, durante 4 minutos. Se determinó el efecto del DTT (100 µM) sobre dicha pegada. Al medio con 2 mg de proteína se adicionó NEM (200 µM). Se centrifugó durante 10 min a 10 000 rpm, se recuperó el precipitado.

ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS QUE UNEN $^{109}\text{Cd}^{2+}$ POR AUTORADIOGRAFÍA.

Se emplearon las condiciones de los ensayos precedentes, pero utilizando $^{109}\text{Cd}^{2+}$ (actividad específica 100 000 cpm/ηmol), para identificar las proteínas a las que se une el cadmio y los cambios que se producen en la marca en presencia de DTT (0,50,75 y 100 μM); con y sin NEM (200 μM).

OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS QUE UNEN $^{109}\text{Cd}^{2+}$ POR ELECTROELUCIÓN.

Se expusieron mitocondrias (10 mg) a 3 μM de $^{109}\text{Cd}^{2+}$, en presencia de NEM (40 y 200 μM) incubadas durante 10 min, eliminando la NEM libre por centrifugación. Las proteínas se separaron por electroforesis de elución continua (Prep Cell.BIORAD;12 W constante), en un gel de acrilamida 9%, en condiciones desnaturalizantes. Las diferentes fracciones obtenidas de la electroelución se leyeron en un contador de gammas. Las muestras con registros más altos de marca radioactiva, se corrieron en un gel desnaturalizante de acrilamida 10%; para detectar el peso molecular de las proteínas marcadas el gel se tiñó con nitrato de plata.

SOLUBILIZACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES.

Se realizaron curvas de solubilización de las proteínas mitocondriales con CHAPS (3-(3-Colamidopropil)Dimetil-amonio-propano sulfonato) empleando concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, y 1.5%.

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE CONTIENEN GRUPOS TIOLÉS SENSIBLES A Cd²⁺.

Las proteínas solubilizadas y tratadas con NEM (200 μ M) se pasaron a través de una columna de afinidad hacia grupos tioles (Affi-501-organomercurial, BIORAD); después de varios lavados en TRIS 10 mM pH 7.5, se desprendieron con DTT 0.1 M. Las proteínas eluidas con DTT se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 10% y se efectuó una tinción con azul de Coomassie.

- Todos los experimentos contaron con un mínimo de 4 repeticiones.

RESULTADOS

Es un hecho ampliamente documentado que el fenómeno de la transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM) ocurre tras una acumulación masiva de Ca^{2+} , en presencia de un agente inductor. Se midió la salida de calcio para determinar el establecimiento del estado hiperpermeable de la membrana. En la figura 1, se observa que 50 μM de Ca^{2+} presente en el medio no induce el fenómeno, hasta que se agregan concentraciones del orden micromolar de Cd^{2+} que actúa como inductor. A partir de la adición de 3 μM de este catión divalente se observa la salida de Ca^{2+} . El efecto se desarrolla con lentitud durante el minuto posterior a la adición del inductor a las concentraciones más bajas. A partir de 5 μM de CdCl_2 la velocidad de salida de Ca^{2+} se incrementa y se libera la totalidad del calcio acumulado. Se cuantificó la cantidad de calcio liberado por Cd^{2+} , utilizando $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por el método de filtración.

En la figura 2A se observa que la adición de 5 μM de Cd^{2+} es suficiente para generar la liberación de ~ 60 nmol de $\text{Ca}^{2+} / \text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$ de la matriz mitocondrial, y se obtiene una $K_{0.5}$ de 1.93 μM . En la figura 2B, el medio se suplementó con 200 μM de NEM (N-etilmaleimida), en estas condiciones sólo se requiere de 2.5 μM de Cd^{2+} para inducir la transición de la permeabilidad, y liberar la totalidad de Ca^{2+} acumulado. Así la $K_{0.5}$ se reduce a 0.8 μM .

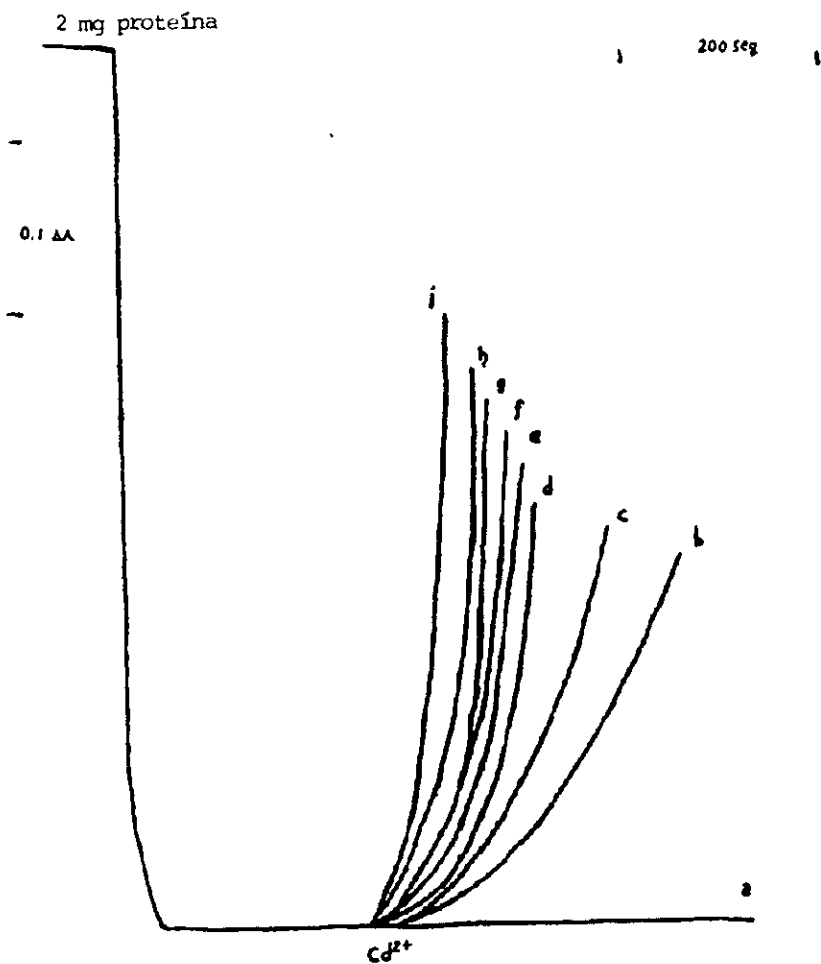


Fig.1 Liberación de Ca^{2+} inducida por diferentes concentraciones de CdCl_2 (a-0, b-3, c-4, d-5, e-6, f-7, g-8, h-9 i-10 μM). Se agregaron 2 mg de proteína a un medio que contenía sacarosa 0.25 M, succinato 0.01 M, HEPES 0.01M, ADP 200 μM , Pi 2mM, Rotenona 10 mg/ml, Arsenazo III 50 μM , y CaCl_2 50 μM ; pH 7.3 a 25°C. Los movimientos de Ca^{2+} se siguieron espectrofotométricamente a 675-685 nm.

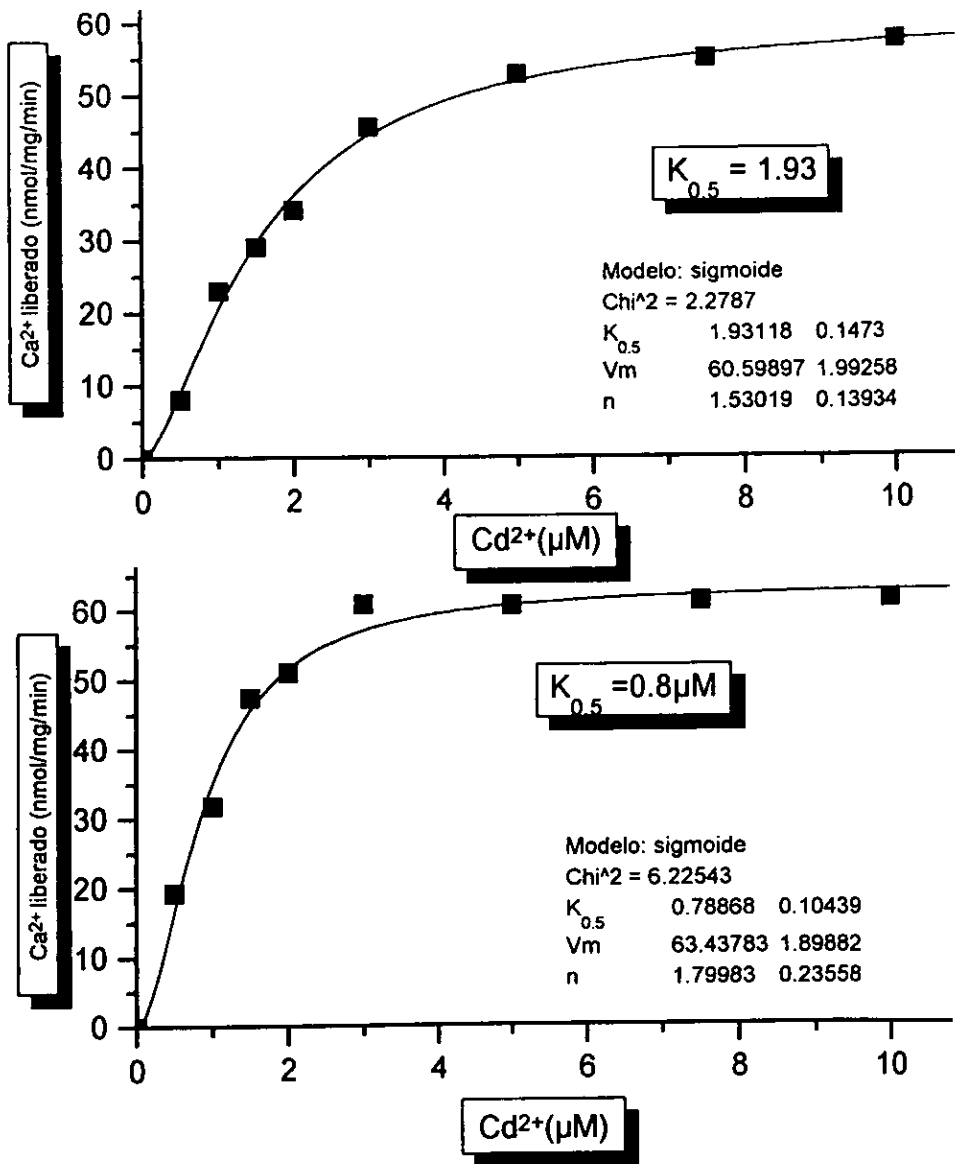


Figura 2. A. Efecto del Cd²⁺ sobre la liberación de Ca²⁺ en mitocondrias de riñón de rata; B. Liberación de calcio inducida por cadmio, en presencia de NEM (incubación de 8 min). Las condiciones de incubación fueron las mismas que en la figura 1, utilizando ⁴⁵Ca²⁺. El tiempo de incubación con cadmio fue de 4 minutos. Los valores de ⁴⁵Ca²⁺ se obtuvieron por filtración de una alícuota de 200 μL en filtros micropore, ajustando los resultados a la concentración graficada. La K_{0.5} se obtuvo mediante la ecuación de Hill para el modelo cinético sigmoideal.

Se realizó un ajuste no lineal utilizando el programa Origin para cinéticas y determinamos que el modelo que mejor se ajusta a los resultados experimentales es el sigmoidal, lo que implica que existe cooperatividad.

Se aplicó la ecuación de Hill para el modelo cinético sigmoidal, para obtener de manera teórica y de acuerdo a los resultados la velocidad máxima (V_m), la $K_{0.5}$ que corresponde a la concentración requerida para obtener la mitad de la velocidad máxima y el valor de n de la ecuación de Hill, que corresponde a la cantidad de probables sitios de cooperatividad. Cuando n tiene un valor entre 1 y 2 significa que existen un mínimo de dos sitios de unión.

Considerando que existen al menos dos sitios cooperativos, que representan los sitios principales de interacción con el Cd^{2+} , para promover la TPM, podríamos proponer que la saturación del primer sitio es necesaria para que el Cd^{2+} se una al segundo sitio lo que se manifiesta con una liberación mayor de Ca^{2+} .

Al utilizar NEM se disminuye la cantidad de cadmio necesaria para inducir la TPM, se bloquean sitios inespecíficos y existen menos sitios a los cuales pueda unirse el cadmio. La unión del cadmio a los sitios específicos está facilitada, y la cooperatividad establecida entre los 2 sitios se mantiene.

En la figura 3 se observa que al incrementar la concentración de NEM se disminuye la concentración de Cd^{2+} necesaria para liberar el Ca^{2+} acumulado. Concentraciones mayores de NEM (hasta $400 \mu\text{M}$), no son suficientes para inducir por si mismas la TPM.

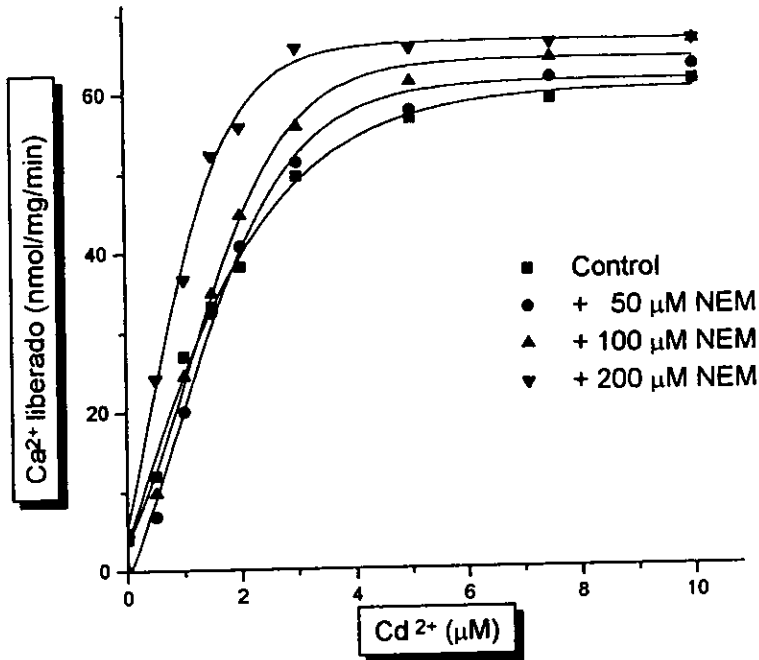


Figura 3. Efecto del incremento en la concentración de NEM sobre la liberación de Ca^{2+} inducida por Cd^{2+} . Las condiciones de incubación son las mismas que en la figura 2.

Se sabe que la ciclosporina A (CSA) es el inhibidor más potente y específico de la TPM; sin embargo bajo las condiciones experimentales utilizadas, la adición de CSA (desde 0.25 hasta $4 \mu\text{M}$) solo inhibió parcialmente y de manera temporal el efecto del cadmio sobre la TPM (no se muestra).

Para determinar la concentración de grupos -SH que pueden reaccionar con Cd^{2+} , se titularon con el compuesto DTNB. Se encontró un contenido de aproximadamente 7 ± 1.2 nmol-SH/mg de proteína. En presencia de NEM (10, 20, 40, 50, 100 y 200 μM) y bajo las mismas condiciones que en la figura 3, se observó una disminución en los residuos sulfhidrilos capaces de titularse con DTNB. Según se muestra en la figura 4 alrededor de 5 nmoles de grupos tioles/mg de proteína fueron bloqueados de manera inespecífica con 200 μM de NEM.

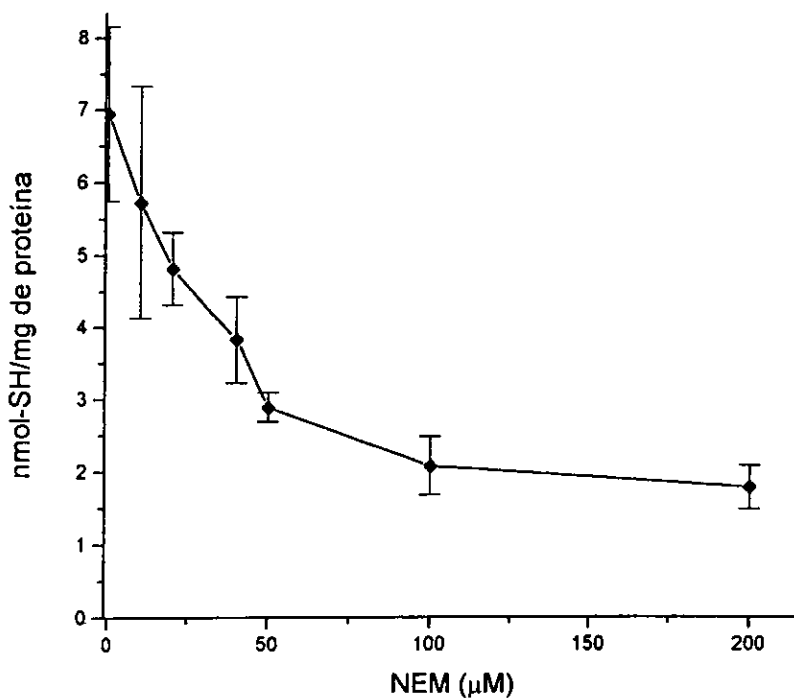


Figura 4. Cuantificación de los grupos tioles capaces de unir Cd^{2+} en presencia de NEM. En el medio estandarizado, se agregaron 2 mg de proteína; adicionando DTNB en exceso (~200 nmoles). Se utilizó una curva estándar de cisteína. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 232 nm. Los valores representan Media \pm desviación estándar, $n=3$.

Se determinó el número de nmol de Cd^{2+} susceptibles de unirse a proteínas mitocondriales con y sin NEM. En la tabla I se muestran los resultados. Hasta $20 \mu\text{M}$ no hay saturación en ninguno de los dos casos. En presencia de NEM la cantidad de Cd^{2+} unido disminuye a partir de la adición de 2 nmol de Cd^{2+} en relación a las mitocondrias que no fueron incubadas con el reactivo para monotioles.

$^{109}\text{Cd}^{2+}$ (nmol)	nmol de Cd^{2+} pegado/mg de proteína	
	Sin NEM	NEM ($200\mu\text{M}$)
1	0.66	0.74
2	1.4	1.2
3	2.89	2.22
5	3.08	2.66
7	4.11	3.45
9	8.57	4.1
20	12.3	9.7

Tabla I. Unión de Cd^{2+} a proteínas mitocondriales. Empleando las condiciones estandarizadas se midió la cantidad de cadmio que se une a las proteínas mitocondriales, dependiendo de la concentración añadida. Se utilizó $^{109}\text{Cd}^{2+}$ (Act. Especifica 100 000 cpm/nmol). Se adicionó el Cd^{2+} al medio estandarizado con 2 mg de proteína y se centrifugó a los 4 min. a 10 000 rpm, durante 10 minutos. Se lavó y se centrifugó nuevamente, midiéndose la radioactividad en el precipitado.

Estos resultados muestran que en presencia de 3 nmol de Cd^{2+} y $200 \mu\text{M}$ de NEM se unen poco más de 2 nmol de Cd^{2+} a las mitocondrias y si observamos la figura 2 con

esta concentración es suficiente para favorecer la apertura del poro de la transición de la permeabilidad. Parte de estos 2 nmol de Cd^{2+} podrían reaccionar con los 2 nmol-SH/mg de proteína expuestos del lado externo de la membrana interna mitocondrial (Fig.4). Sin embargo, el cadmio puede también unirse a sitios que el DTNB no es capaz de titular en la cara que mira a la matriz de la membrana interna.

Para determinar en que lado de la membrana se unen el cadmio que provoca la TPM, medimos el potencial de membrana mitocondrial. En la figura 5 se muestra la caída del potencial tras la aplicación de 5 μM de Cd^{2+} . Al igual que en las determinaciones de transporte el efecto del Cd^{2+} no es inmediato. Cuando se añade rojo de rutenio (inhibidor específico del uniportador de Ca^{2+}), se retarda temporalmente el efecto, e incluso hay una momentánea y ligera recuperación del potencial. Cuando se agrega EGTA (100 μM) para quelar cualquier ion divalente externo, la adición de 5 μM de cadmio no tiene efecto sobre el potencial (a). Este mismo trazo (a) representa la adición al medio de 166 ηM de rojo de rutenio, como se observa el Cd^{2+} en estas condiciones no colapsa el gradiente eléctrico. El Ditiotreitól (DTT) que es un agente reductor de grupos tioles, reestablece el potencial de manera dependiente de la concentración (b-d). La recuperación total se consiguió con 100 μM de DTT (d). Se agregó CCCP que es un desacoplante mitocondrial, para abatir completamente el potencial.

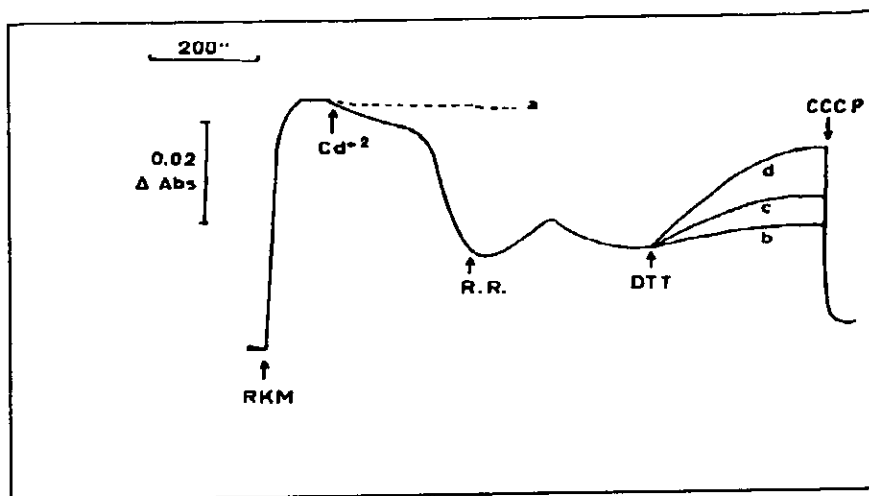


Figura 5. Efectos del DTT sobre el reestablecimiento del potencial de membrana en mitocondrias expuestas a cadmio. El potencial de membrana se midió en un espectrofotómetro de doble haz a 533-511 nm, con el indicador safranina. Las adiciones se realizaron de la siguiente manera: 2 mg de proteína; 5 μM de Cd^{2+} ; 0.166 μM de rojo de rutenio; Ditiotreititol de 50 a 100 μM ; 10 μM de CCCP. Las condiciones de incubación fueron las mismas que en los ensayos anteriores, excepto que se agregó al medio 10 μM de Safranina. En (a) el medio se suplementó con 100 μM de EGTA ó 166 ηM de rojo de rutenio; b-d representa concentraciones crecientes de DTT: b) 50 μM , c) 75 μM , y d) 100 μM .

Se ha reportado que el DTT puede atravesar la membrana y reducir los grupos tioles (Chávez y Holguín, 1985); estos experimentos nos permiten concluir que el sitio de unión para Cd^{2+} está localizado en el lado de la matriz de la membrana interna.

Con la figura 5 se refuerza que el Cd^{2+} además de unirse a tioles externos, puede entrar a la matriz mitocondrial, por el uniportador de Ca^{2+} , para ejercer su efecto inductor de la TPM, ya que al agregar rojo de rutenio se retarda el efecto o es menor la disminución del potencial transmembranal; además que si el cadmio no entra a la matriz, el potencial se mantiene intacto.

Una vez establecida la concentración mínima de Cd^{2+} que induce la liberación de Ca^{2+} , y para comprobar el efecto del DTT al revertir el colapso del potencial de membrana inducido por Cd^{2+} , se midió la salida de Ca^{2+} inducida por Cd^{2+} en presencia de DTT. En la figura 6 se observa que a medida que se aumenta la concentración de DTT, disminuye la cantidad de Ca^{2+} fuera de la mitocondria.

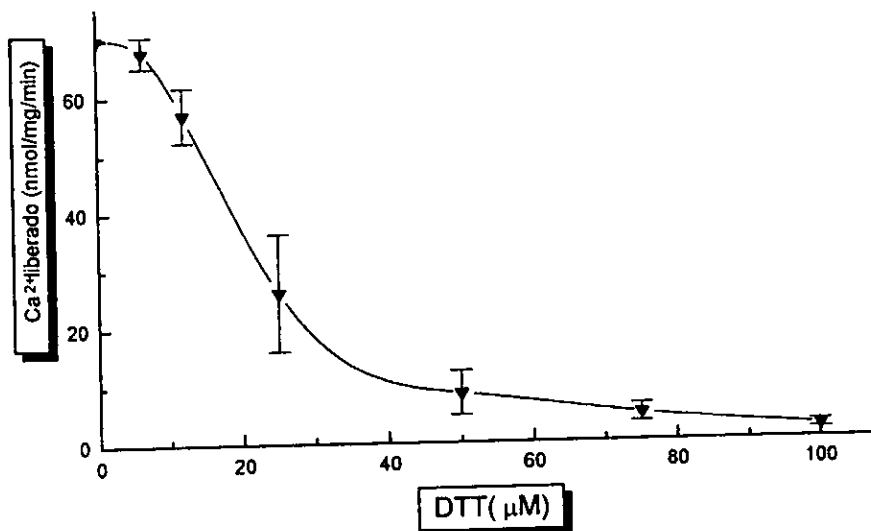


Figura 6. Inhibición por DTT de la liberación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ inducida por Cd^{2+} . La salida de calcio se midió con la técnica de filtración utilizando $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (actividad específica 1000 cpm/nmol). Las condiciones experimentales fueron las mismas que en las figuras precedentes. Los valores representan media \pm desviación standard, $n=5$.

Los experimentos de las figuras 5 y 6 corroboran la hipótesis de que la TP es modulada por el estado de oxidación de los grupos -SH de la membrana interna mitocondrial.

Se buscó identificar a las proteínas que unen cadmio en las condiciones descritas, y para ello se utilizó un análisis por autoradiografía con $^{109}\text{Cd}^{2+}$ (figura 7). La autoradiografía presenta importantes cambios en el patrón de las proteínas marcadas

dependiendo del aumento en las concentraciones de ditioneitol, en relación a las mitocondrias control (sin DTT).

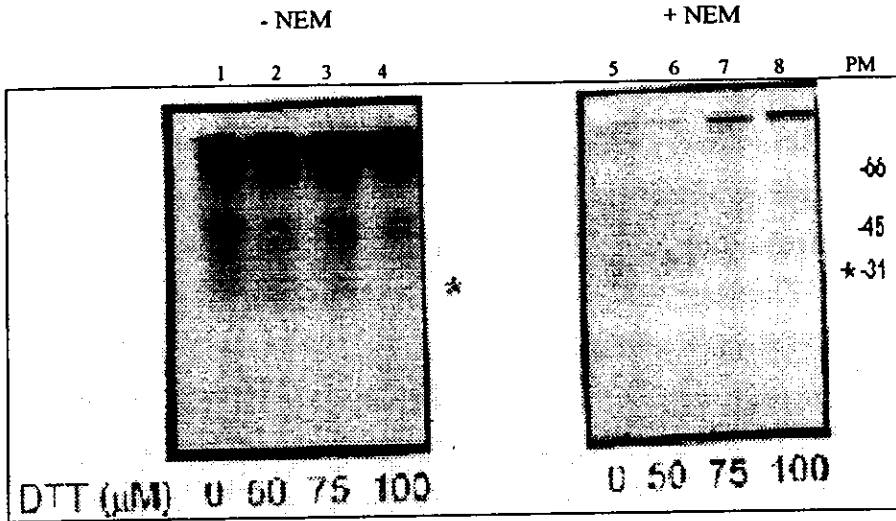


Figura 7. Efecto del DTT sobre la unión de $^{109}\text{Cd}^{2+}$ a proteínas mitocondriales, tratadas con NEM. Las proteínas de los carriles 1-4 no se incubaron con NEM. A los carriles 5-8 se adicionó NEM (200 μM).

Las mitocondrias se trataron como se describe en la figura 6, usando $^{109}\text{Cd}^{2+}$ (actividad específica 100 000 cpm/nmol) y se separaron en un gel de poliacrilamida al 9%. Una vez seco el gel se expuso con una placa de autoradiografía durante 5 días.

En las mitocondrias en las que no se bloquearon los grupos tioles con NEM (carriles 1-4), la marca en los péptidos de aproximadamente 30 kDa disminuyó progresivamente al aumentar la concentración de DTT.

En presencia de NEM la marca inespecífica disminuye notablemente (5-8); al incubar las proteínas con DTT la banda de 30 kDa pierde totalmente la marca. También disminuye la marca en una proteína de ~52 kDa bajo estas condiciones.

La marca del péptido de 30 kDa en mitocondrias control con y sin NEM (carril 1 y 5 respectivamente) no muestra variaciones.

Para determinar si la disminución de la marca observada en la autoradiografía, corresponde con el Cd^{2+} unido en mitocondrias intactas en presencia de DTT, se cuantificó el $^{109}\text{Cd}^{2+}$ unido en las condiciones ya mencionadas.

En la Tabla II se presenta la cantidad de cadmio unido a la mitocondria. Tras la acción reductora del DTT obtuvimos que al incubarse con $3\mu\text{M}$ de Cd^{2+} , se pegaron aproximadamente 3 nmol/mg de proteína sin NEM y 2 nmol/mg con NEM.

(nmol de Cd^{2+} /mg de proteína)				
Cd^{2+} ($3\mu\text{M}$)			Cd^{2+} ($5\mu\text{M}$)	
		DTT ($100\mu\text{M}$)		DTT ($100\mu\text{M}$)
Sin NEM	2.58 ± 0.98	2.93 ± 1.14	2.82 ± 0.26	2.82 ± 0.41
NEM ($200\mu\text{M}$)	1.58 ± 0.5	2.04 ± 0.7	2.33 ± 0.5	2.02 ± 0.16

Tabla II. Cuantificación de Cd^{2+} unido/mg de proteína, empleando $^{109}\text{Cd}^{2+}$ (Act. específica $100\,000\text{ cpm/nmol}$). Al medio descrito se le agregaron 2 mg de proteínas mitocondriales y se adicionaron las concentraciones de $^{109}\text{Cd}^{2+}$ indicadas. Después de 4 minutos se agregó DTT, permitiendo la reducción de tioles durante un minuto y se centrifugó a $10\,000\text{rpm}$ durante 10 minutos . Se recuperó el botón y se sometió al conteo. Valores representan media \pm desviación estándar, $n=4$.

Al aplicar DTT $100\mu\text{M}$, la cantidad de cadmio pegado en la mitocondria no varió. Cuando se adicionaron $5\mu\text{M}$ de Cd^{2+} la cantidad de cadmio pegado se mantuvo entre 2 y 3 nmol/mg , de acuerdo con las desviaciones estándar. Este comportamiento sugiere una

redistribución de la marca en proteínas cuyos tioles no son críticos para la abertura del poro. Analizando la figura 7 parecen ser proteínas de alto peso molecular.

Con el propósito de aislar las proteínas marcadas, se expusieron mitocondrias a $2\mu\text{M}$ $^{109}\text{Cd}^{2+}$ en presencia de NEM, y se separaron por electroelución continua en condiciones desnaturalizantes (Fig. 8a).

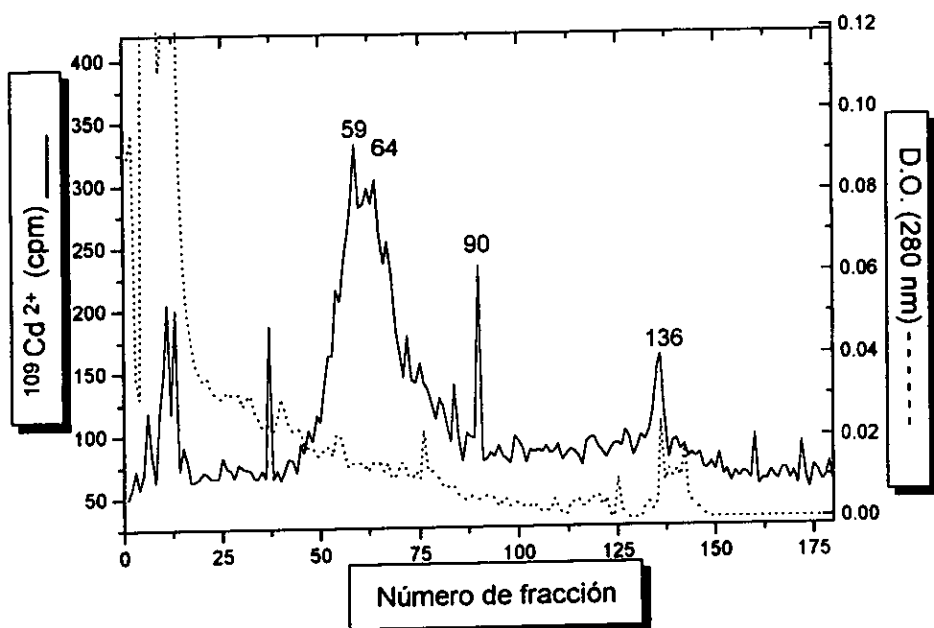


Figura 8A. Perfil de elución de proteínas mitocondriales marcadas con $^{109}\text{Cd}^{2+}$, separadas por electroelución continua en un gel al 9%, en presencia de bajas concentraciones de NEM ($40\mu\text{M}$). Se colectaron las fracciones con mayor marca radioactiva y se efectuó una segunda separación por electroforesis analítica.

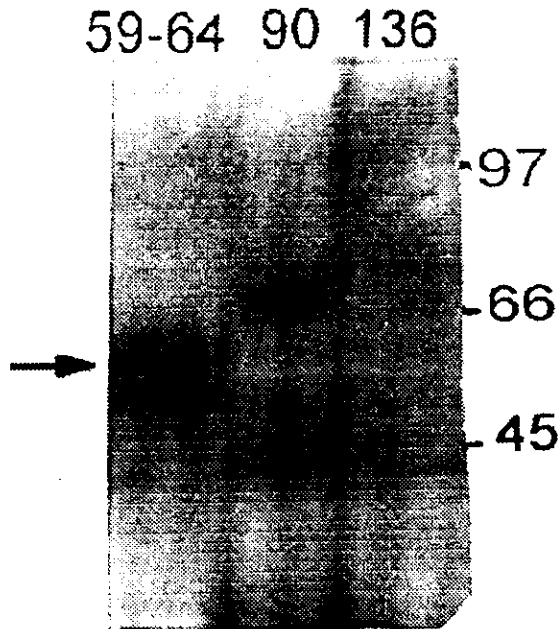


Figura 8B. Tinción con plata de las proteínas separadas por electroelución continua, marcadas con $^{109}\text{Cd}^{2+}$. La concentración del gel de acrilamida 10%. Cabe aclarar que los carriles no poseen la misma concentración de proteína. Los carriles 59-64, 90 y 136 corresponden a los picos de marca radioactiva de la figura 8A. MW-pesos moleculares.

El análisis de las proteínas separadas por electroelución y que presentan la mayor densidad de marca radioactiva corresponden a péptidos con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa (Fig 8b), aunque existen otros picos de marca relacionados con péptidos de menor peso molecular. La densidad de marca corresponde con la imagen obtenida por autoradiografía (Fig. 7) en condiciones en que no hay NEM (carriles 1-4).

Continuando con la búsqueda de las proteínas que aparecen marcadas específicamente con $^{109}\text{Cd}^{2+}$ en la figura 7 (+ 200 μM NEM), separamos proteínas marcadas con $^{109}\text{Cd}^{2+}$ en dichas condiciones en un gel al 9% por electroelución continua.

En la figura 9A se muestra el perfil de elución en esas condiciones y en la 9B la imagen de las proteínas con marca radioactiva que corresponden a proteínas de ~30 kDa.

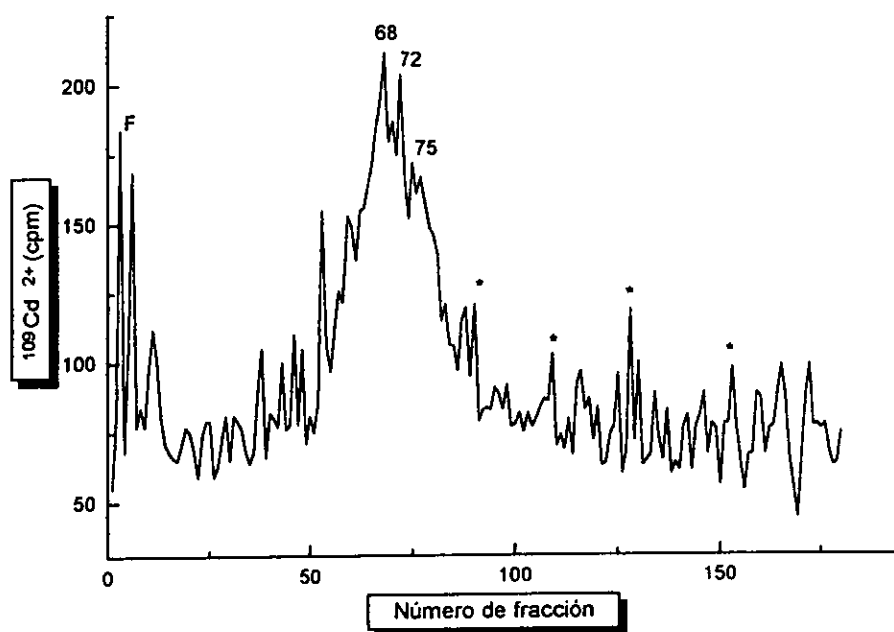


Figura 9A. Perfil de marca radioactiva, obtenida por electroelución, de mitocondrias expuestas a $^{109}\text{Cd}^{2+}$ previamente incubadas con NEM 200 μM .

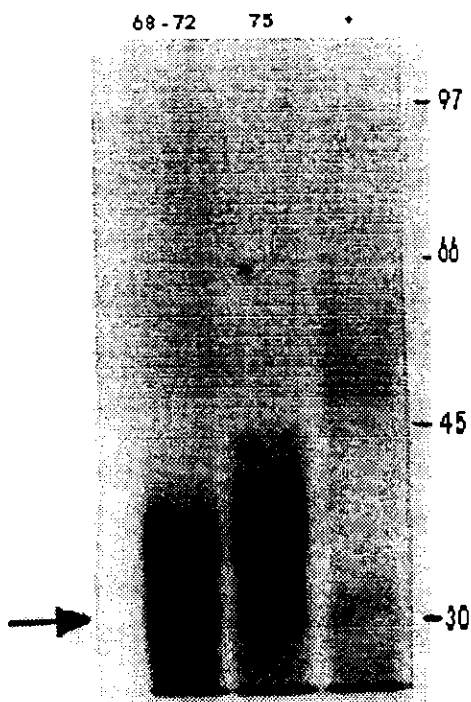


Figura 9B. Tinción con plata de las fracciones con marca radioactiva, sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes. Se presentan los picos con mayor marca radioactiva de la figura 9A (68-72,75). El carril con * es proteína sin marca (utilizada como control de peso molecular).

Además de la técnica descrita, se intentó aislar a las proteínas que unen Cd^{2+} utilizando una columna de afinidad hacia grupos tioles. Para obtenerlas en estado nativo, se empleó el detergente CHAPS, que tiene la propiedad de romper las interacciones no específicas de las proteínas, no las desnaturiza y es eléctricamente neutro.

En la figura 10 se muestra la curva de solubilización con CHAPS. A una concentración de 0.5% el CHAPS solubiliza 1 mg de proteína. Las proteínas mitocondriales solubilizadas mantienen unida la marca en presencia de concentraciones de hasta 1.5% de CHAPS.

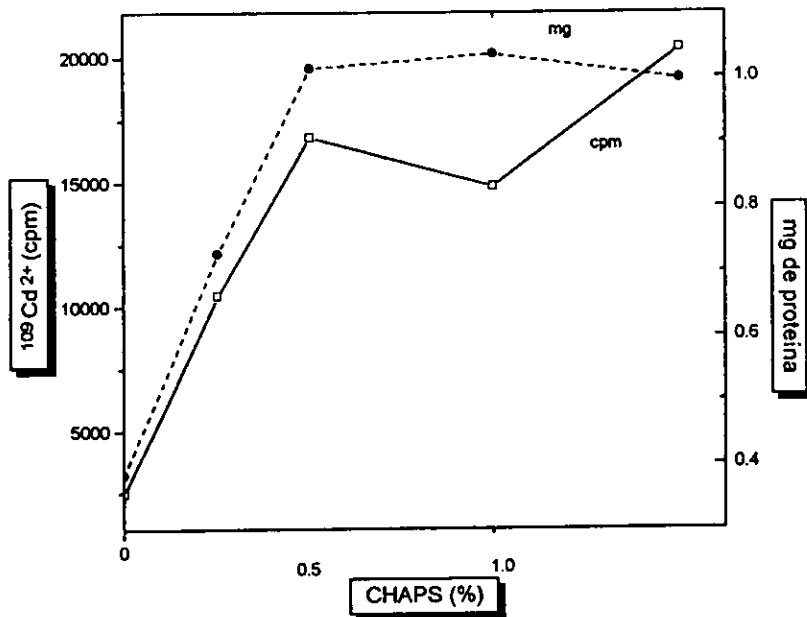


Figura 10. Curva de solubilización con CHAPS, de proteínas mitocondriales marcadas con $^{109}\text{Cd}^{2+}$. Las mitocondrias (2mg) se marcaron con $5\ \mu\text{M}$ de Cd^{2+} (en presencia de $200\ \mu\text{M}$ de NEM); y se lavaron como se describió en la Tabla II. El botón se resuspendió en una solución con concentraciones crecientes de CHAPS. □ Marca en el sobrenadante; ● proteína en el sobrenadante.

En la figura 11 se muestran las proteínas obtenidas de la columna de afinidad hacia grupos tioles, son alrededor de 14 proteínas. El rendimiento de esta columna de afinidad fue muy pobre, del 0.1% (de 100 mg se obtuvieron aproximadamente 100 μg). Al

comparar los carriles de la proteína total (A), y las del lavado (B), con las proteínas que poseen grupos -SH (C), se evidencian patrones diferentes.

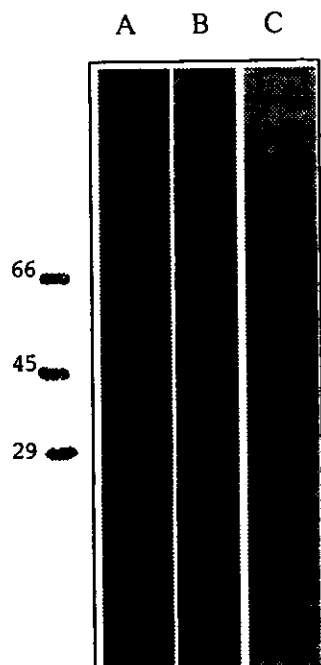


Figura 11. Tinción con azul de Coomassie de proteínas mitocondriales, eluidas de una columna de afinidad para grupos tioles y separadas con DTT, en gel de poliacrilamida al 10%. Se solubilizaron ~100 mg de proteínas mitocondriales de riñón de rata en 0.75% de CHAPS y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se separó por cromatografía de afinidad en una columna organomercurial. El carril A representa el perfil de las proteínas totales; en el carril B se separaron las proteínas que no se unen a la resina. El carril C representa las proteínas que se unieron a la resina y se despegaron con 1 mM de DTT.

Las proteínas que se obtuvieron por cromatografía de afinidad incluyen las dos entidades identificadas por autoradiografía (52 y 30 kDa); sin embargo se unen otras proteínas. Esta diferencia puede ser resultado de la exposición de nuevos grupos tioles tras la solubilización con CHAPS. Para demostrarlo se determinaron los grupos tioles titulables con DTNB, en esta condición (Tabla III).

Mitocondrias solubilizadas (nmol de grupos tioles/mg de proteína)			
	Sin Cd ²⁺	Cd ²⁺ (3 μM)	DTT (100 μM)
Sin NEM	65.27	60.2	131.1
NEM (200 μM)	50.35	47.8	93.7

Tabla III. Tioles protéicos titulables con DTNB con diferentes tratamientos. Las proteínas se solubilizaron con CHAPS 1%/mg de proteína.

Al solubilizar las proteínas aumenta el número de tioles titulables con DTNB a 65.27nmol/mg, sin NEM y; a 50.35nmol/mg de proteína en presencia de NEM comparado con los valores obtenidos en la figura 4; lo que explica la unión de un mayor número de proteínas a la comuna de afinidad.

DISCUSIÓN

Existen diversos trabajos que sugieren la participación de los grupos tioles en la regulación de la TPM (Bernardi et al., 1992; Fagian et al., 1990; Bernardes et al., 1994; Petronilli et al., 1994). Rasheed et al (1984), Chávez et al (1985) y Zoratti y Szabó (1995), reportan la participación del Cd^{2+} como inductor de la transición de la permeabilidad, debido a la unión de este catión a grupos tioles. Rasheed y colaboradores (1984) proporcionan evidencia de que existen al menos dos tipos de grupos de tioles en mitocondrias de hígado de rata que pueden interactuar con el cadmio, uno de esos provoca hinchamiento y no requiere la presencia de ningún otro catión y el otro se relaciona con el transporte de H^+ .

En 1985, Chávez y colaboradores, reportaron la salida masiva de calcio a través del poro de la transición de la permeabilidad, provocada por $30 \mu M$ de Cd^{2+} , a esta concentración el Cd^{2+} actúa también sobre otras proteínas, como el sitio activo de la succinato deshidrogenasa (Jay et al., 1991). En este trabajo la transición de la permeabilidad se indujo con cadmio, utilizando bajas concentraciones ($5 \mu M$).

En nuestros resultados se observa que existen ciertos grupos tioles, a los cuales se une el cadmio, pero que no intervienen en la apertura del poro. La aplicación de NEM ($200 \mu M$), disminuye la pegada de Cd^{2+} en sitios inespecíficos, permitiendo que concentraciones menores de cadmio alteren los grupos tioles críticos induciendo la TPM. La concentración utilizada de NEM, por sí misma no actúa como inductor del fenómeno.

En 1994, Bernardes menciona el efecto preventivo de la NEM (20 μM), sobre la acción del óxido de fenilarsina (PhAsO), que es un inductor de la TPM; esto implica que el entrecruzador de grupos tioles PhAsO reacciona con tioles que puede ocupar la NEM. Por ello puede decirse que los sitios a los que se une el Cd^{2+} , no son los mismos a los que se une el PhAsO, pues la adición de NEM incluso a concentraciones mayores (400 μM) no previene la TPM, sino por el contrario, hace más específica la unión del Cd^{2+} . Es factible que exista más de un sitio de regulación del PTP, por parte de ciertos grupos tioles críticos.

En las condiciones experimentales utilizadas el agente reductor (DTT) es capaz de revertir el fenómeno de la TPM, rompiendo el enlace formado por el cadmio con dos tioles vecinos (S-Cd-S), que se manifiesta con la recuperación del estado impermeable de la mitocondria y con la disminución de la marca en proteínas específicas. Estos datos corresponden con lo reportado por Fagian et al (1990); Beatrice et al (1984) y Chávez et al (1985); quienes revierten el daño provocado por prooxidantes mas Ca^{2+} con DTT.

El Cd^{2+} es un catión que puede oxidar grupos sulfhidrilo de ambos lados de la membrana interna mitocondrial. La orientación de los tioles que regulan el PTP, es materia de debate.

Nuestros resultados demuestran que el agente reductor DTT, revierte la despolarización de la membrana y la salida de Calcio inducida por Cd^{2+} en mitocondrias. Al respecto Chávez y Holguín (1988) han propuesto que el carácter hidrofóbico del DTT le permitiría tener acceso a tioles orientados hacia la matriz mitocondrial. Más aún, encontramos que en presencia de rojo de rutenio, el potencial de membrana se recupera parcialmente, una vez iniciado el proceso de permeabilización, pero puede

evitarse bloqueando al uniportador de calcio antes de agregar Cd^{2+} . Se ha demostrado que el Cd^{2+} entra a la matriz a través del uniportador de Ca^{2+} , de manera competitiva con el calcio (Chávez et al., 1985) y es sensible a rojo de rutenio.

En otros trabajos Chávez y Holguín (1988) y Kowaltowski, et al (1997), reportaron que compuestos hidrofílicos afines a grupos tioles, como el mersalil, no pueden revertir el fenómeno, fortaleciendo la propuesta de la orientación hacia la matriz de los tioles que regulan la TPM.

Se han cuantificado alrededor de 100 nmol de tioles totales/mg de proteína (Valle y colaboradores, 1993 y Rigobello et al., 1995), de los cuales la mayoría son tioles inespecíficos que pueden bloquearse con NEM y que no participan en el fenómeno de la TPM; nuestros resultados nos hacen sugerir que con Cd^{2+} se modifican sólo 2-4 nmol-SH/mg de proteína y que esto es suficiente para que el PTP se active.

En 1990 Gunter y Pfeiffer, enumeran una impresionante lista de sustancias (metales, ácidos grasos, reactivos de grupos sulfhidrilo, etc.) que inducen la transición de la permeabilidad, y que además son dependientes de Ca^{2+} . En algunos de estos casos se ha propuesto que el Ca^{2+} expone tioles protéicos membranales y los hace asequibles a la acción de agentes hidrofílicos mono y bifuncionales, como el DIDS (ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno -2,2' disulfónico) (Bernardes et al., 1994) o el Mersalil (Kowaltowski et al., 1997). Sin embargo, existen reportes en que el Ca^{2+} en presencia de compuestos hidrofóbicos no es necesario para inducir el fenómeno. Rasheed et al (1984), utilizaron Cd^{2+} para hiperpermeabilizar la membrana; Lenartowicz et al (1991) lo hacen con PhAsO; tampoco en nuestras condiciones es indispensable el Ca^{2+} para que el cadmio altere la permeabilidad mitocondrial.

En 1991 Fagian y colaboradores, y Valle et al (1993) plantean la participación de radicales libres en la transición de la permeabilidad como un efecto secundario a la acción de prooxidantes. En estos trabajos presentan evidencias de que bajo condiciones de estrés oxidativo generado por algunos prooxidantes, como la diamida, y con la exposición de tioles protéicos con Ca^{2+} , los cuales son atacados por radicales libres, se provoca el fenómeno de la TPM. En nuestros ensayos, el Cd^{2+} no requiere de calcio para poder interactuar sobre los tioles críticos; y la reversión del fenómeno con DTT es de manera inmediata. Lo anterior nos sugiere que el efecto del Cd^{2+} no está relacionado directamente con la lipoperoxidación; aunque podría dañarse indirectamente la fase lipídica de la membrana, debido a la alteración de la cadena respiratoria, generando posteriormente los radicales libres (Azzone y Luvisetto, 1988; Nicolli, et al., 1993).

El Cd^{2+} se une a tioles de diferentes proteínas. Con NEM, la unión se hace más específica y al reducirlos con DTT, el número de proteínas marcadas disminuye y cambia el perfil de marca en las autoradiografías.

La oxidación de los grupos tioles puede dar lugar a entrecruzamientos intrapeptídicos o interpeptídicos (Fagian et al., 1990; Zazueta et al., 1998). En las condiciones utilizadas no se detectó la formación de agregados, por lo que la disminución de la marca específica tras la adición de DTT en los péptidos de aproximadamente 30 y 52 kDa, nos hacen suponer que los tioles que regulan el poro de la transición de la permeabilidad involucran a una entidad, que pueden ser las proteínas de los pesos moleculares mencionados.

Existen antecedentes respecto a la participación de un péptido de 30 kDa (el translocador de adenín nucleótidos -AdNT), como la estructura constituyente del poro,

(Hunter y Haworth, 1979). Algunos proponen que sólo el estado conformacional "c" del translocador, puede adoptar el papel de poro inespecífico (Le Quoc y Le Quoc, 1988).

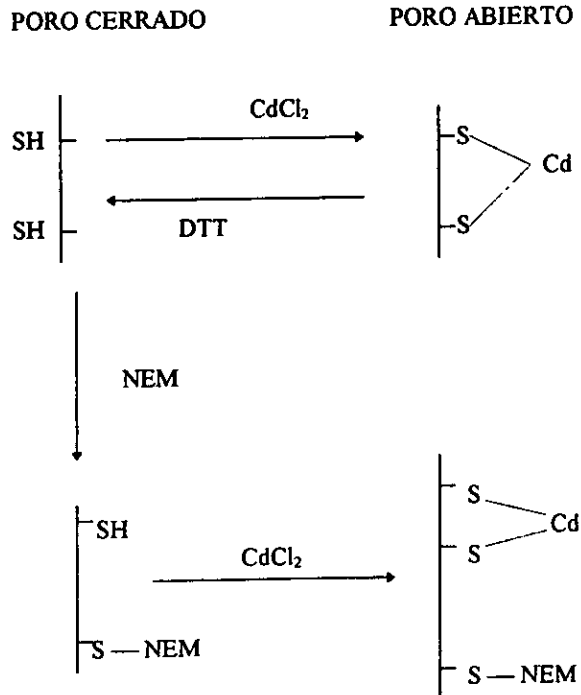
En 1981, Mc Enery propone el modelo del megacanal formado por el AdNT, una porina con un peso molecular de 52 kDa, y dos proteínas de 18 kDa. En nuestras condiciones experimentales la marca se distribuye entre péptidos de ~52 y 30 kDa; tras bloquear los grupos -SH inespecíficos, la marca se conserva sólo en proteínas de ~ 30 kDa, por lo que sugerimos que el Cd^{2+} podría unirse al AdNT. Vignais y Vignais (1972), y Majima, et al (1994), demostraron que el cambio conformacional "m" a "c" del AdNT cambia la posición de los grupos tioles de esta proteína. Estas alteraciones son insensibles a CsA, tal como ocurre bajo nuestras condiciones en que este compuesto solo inhibe ligeramente el fenómeno provocado por Cd^{2+} . Por su parte Kowaltowski y Castilho (1997) también demostraron que la inducción de la TPM debido a la modificación de grupos tioles específicos, es insensible a CsA.

Al intentar aislar la proteína, por electroelución, colectamos las fracciones que presentaron mayor marca, y obtuvimos proteínas de aproximadamente 52 kDa sin NEM y de 30 kDa mas NEM.

Estas proteínas podrían formar el poro; sin embargo, al ser la transición de la permeabilidad un fenómeno multifactorial, la inducción de la TPM por Cd^{2+} podría ser debido a la alteración o modificación de proteínas diferentes al multicitado transportador. Cabe mencionar los reportes de Bernardi y Petronilli (1992, 1994, 1996), donde proponen que existe un mecanismo sensible a voltaje, el cual esta mediado por tioles específicos, los cuales no necesariamente están unidos al poro, pero su oxidación es la señal que promueve la TPM.

CONCLUSIONES

1. Bajas concentraciones de cadmio ($5 \mu\text{M}$) inducen la transición de la permeabilidad mitocondrial.
2. La NEM ($200 \mu\text{M}$) bloquea inespecíficamente grupos tioles que no están involucrados en el fenómeno.
3. Aproximadamente 3 nmoles de grupos tioles/mg de proteína están involucrados en el estado de permeabilidad inespecífica.
4. El DTT revierte el fenómeno, redistribuyendo el cadmio que se une a las proteínas.
5. Proponemos que el cadmio forma complejos S-Cd-S, y en presencia de NEM favorece la apertura o cierre del poro de acuerdo al siguiente esquema:



6. Se identificaron proteínas de 30 y 52 kDa, las cuales representan los sitios más importantes de unión al $^{109}\text{Cd}^{2+}$.
7. En presencia de NEM, el Cd^{2+} se une preferentemente a proteínas de ~30 kDa que podría corresponder al translocador de adenin nucleótidos, o formar parte del poro proteináceo responsable de la transición de la permeabilidad mitocondrial.

BIBLIOGRAFÍA

- Akerman,K. and Nicholls,D.1983.Physiological and Bioenergetic Aspects of Mitochondrial Calcium Transport. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 95:150-193.
- Al-Nasser,I. and Crompton,M. 1986. The Reversible Ca^{2+} -induced Permeabilization of Rat Liver Mitochondria. *Biochem. J.*239 (1):19-29.
- Arinze,I. and Hanson,R.1980. Compartmentation and Its Role in Metabolic Regulation. *Principles of Metabolic Control in Mammalian Systems* (Herman et al.eds.) Plenum Press,New York.Cap.13. pp.495-529.
- Azzone,G. and Luvisetto,S.1988. Molecular Eventes in Coupling and Uncoupling of Oxidative Posporylation. *Ann. New York Acad. Sci.*550:277-288.
- Beatrice,M., Stiers,D. and Pfeiffer,D. 1984. The Role of Glutathione in the Reaction of Ca^{2+} by Liver Mitochondria. *J. Biol. Chem.*259 (2):1279-1287.
- Bernardes,C., Meyer-Fernandes,J., Basseres,D., Castilho,R. and Vercesi,A.1994. Ca^{2+} -dependent Permeabilization of the Inner Mitochondrial Membrane by 4, 4' - diisothiocyanatostilbene-2,2' disulfonic acid (DIDS). *Biochim. Biophys. Acta.*1188:93-100.
- Bernardi,P. and Azzone,G.1979. Delta pH Induced Calcium Fluxes in Rat Liver Mitochondria. *Eur. J. Biochem.*102:555-562.
- Bernardi,P. and Azzone,G. 1982. A Membrane Potential-modulated Pathway for Ca^{2+} Efflux in Rat Liver Mitochondria. *FEBS Letters.*139 (1):13-16.

- Bernardi,P., Vassanell,S., Veronesse,P., Colonna,R , Szabó,I. and Zoratti,M.1992. Modulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. Effect of Protons and Divalent Cations. *J. Biol. Chem.*267 (5):2934-2939.
- Bernardi,P., Broekemeier,K. and Pfeiffer,D.1994. Recent Progress on Regulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore; a Cyclosporin-Sensitive Pore in the Inner Mitochondrial Membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26 (5):509-517.
- Bernardi, P.1996.The Permeability Transition Pore. Control points of a Cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim. Biophys Acta.* 1275:5-9.
- Bernardi,P. and Petronilli, V.1996. The Permeability Transition Pore as a Mitochondrial Calcium Release Channel: A Critical Appraisal. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28 (2):131-138.
- Broekemeier, K., Dempsey,M. and Pfeiffer, D. 1989. Cyclosporin A is a Potent Inhibitor of the Inner Membrane Permeability Transition in Liver Mitochondria. *J.Biol.Chem.* 264 (14):7826-7830.
- Carafoli,E.1975. The Interaction of Ca^{2+} with Mitochondria, with special reference to the Structural Role of Ca^{2+} in Mitochondrial and other Membranes. *Moll & Cell. Biochem.* 8 (3):133-140.
- Carafoli,E.1988.In *Integration of Mitochondrial Function.* Lemasters,J., Hackenbrock,C., Thurman,R., and Westerhoff, H. eds., Plenum Press, New York, pp.421-436.

- Chávez,E., Briones,R., Michel,B.,Bravo,C. and Jay,D.1985. Evidence for the Involvement of Dithiol Groups in Mitochondrial Calcium Transport. Studies with Cadmium. *Arch. Biochem. Biophys.* 242 (2):493-497.
- Chávez, E. and Holguín,J. 1988. Mitochondrial Calcium Release as Induced by Hg^{2+} . *J. Biol. Chem.* 263 (8):3582-3587.
- Chávez,E., Zazueta,C., Reyes-Vivas,H., Pichardo,J., Corona,N., Uribe,A. and Chávez,R.1992. Fluorescamine-induced Membrane Permeability in Mitochondria. *Int. J. Biochem.* 24 (11):1779-1784.
- Chávez,E., Moreno-Sánchez,R., Zazueta,C., Rodríguez,J., Bravo,C. and Reyes-Vivas,H.1997. On the Protection by Inorganic Phosphate of Calcium-Induced Membrane Permeability Transition. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29 (6):571-577.
- Chernyak,B. and Bernardi,P.1996. The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur. J. Biochem.* 238:623-630.
- Costantini,P., Chernyak,B., Petronilli,V. and Bernardi,P. 1996. Modulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by Pyridine Nucleotides and Dithiol Oxidation at two Separate Sites. *J. Biol. Chem.* 271 (12):6746-6751.
- Crompton,M. and Costi,A.1988. Kinetic Evidence for a Heart Mitochondrial Pore Activated by Ca^{2+} , Inorganic Phosphate and Oxidative Stress. A Potential Mechanism for Mitochondrial Dysfunction During Cellular Ca^{2+} overload. *Eur. J. Biochem.*178 (2):489-501.
- Denton,R. and McCormack,J. 1990. Ca^{2+} as a Second Messenger within Mitochondria of the Heart and other Tissues. *Annu. Rev. Physiol.* 52:451-466.

- Dierks, T., Salentin, A. and Kramer, R. 1990. Pore-like and carrier-like Properties of the Mitochondrial Aspartate/Glutamate Carrier after Modification by SH-reagents: Evidence for preformed Channel as Structural Requirement of Carrier-mediated Transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1028:281-288.
- Fagian, M., Pereira da Silva, L., Martins, I. and Vercesi, A. 1990. Membrane Protein Thiol Cross-linking Associated with the Permeabilization of the Inner Mitochondrial Membrane by Ca^{2+} plus Prooxidants. *J. Biol. Chem.* 265 (32):19955-19960.
- Gavin, C., Gunter, K. and Gunter, T. 1990. Manganese and Calcium Efflux Kinetics in Brain Mitochondria. Relevance to Manganese Toxicity. *Biochem. J.* 266 (2): 329-334.
- Gornall, A., Bardwell, C. and David, M. 1949. Determination of Serum Proteins by Means of Biuret Reaction. *J. Biol. Chem.* 177:751-766.
- Green, D. and Reed, J. 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science.* Vol.281:1309-1312.
- Griffiths, E. and Halestrap, A. 1991. Further evidence that cyclosporin A protects mitochondria from calcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase. *Biochem. J.* 274:611-614.
- Gunter, T., Wingrove, D., Banerjee, S. and Gunter, K. 1988. Mitochondrial Calcium Transport. *Adv. Exp. Med. Biol.* 232:1-14.
- Gunter, K., Zuscik, M. and Gunter, T. 1991. The Na^+ -independent Ca^{2+} Efflux Mechanism of Liver Mitochondria is not a Passive $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ Exchanger. *J. Biol. Chem.* 266 (32):21640-21648.
- Gunter, T. and Pfeiffer, D. 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* 258:C755-C786.

- Gunter,T.1994. Cation Transport by Mitochondria. J. Bioenerg. Biomembr. 26 (5):465-469.
- Gunter.K. and Gunter,T.1994. Transport of Calcium by Mitochondria. J. Bioenerg. Biomembr. 26 (5):471-485.
- Halestrap,A. and Davidson,A.1990. Inhibition of calcium-induced large amplitude swelling of liver and heart mitochondria by Cyclosporin A. Biochem. J. 268:153-160.
- Hansford,R. 1994. Physiological Role of Mitochondrial Calcium Transport. J. Bioenerg. Biomembr. 26 (5):495-508.
- Hunter,D., Haworth,R. and Southard, J.1976. Relationship between Configuration , Function and Permeability in Calcium-treated Mitochondria. J. Biol. Chem. 251 (16):5069-5077.
- Hunter ,D. and Haworth,R. 1979. The Ca²⁺-induced Membrane Transition in Mitochondria. I. The Protective Mechanisms. Arch. Biochem. Biophys. 195 (2):453-469.
- Hunter, D. and Haworth,R.1980. Allosteric Inhibition of the Ca²⁺-activated Hydrophilic Channel of the Mitochondrial Inner Membrane by Nucleotides. J. Membr. Biol. 54 (3):231-236.
- Ichas,F. and Mazat,J.1998. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. Biochim. Biophys. Acta. 1366:33-50.
- Igbavboa,U., Zwizinski,C. and Pfeiffer,D.1989. Release of Mitochondrial Matrix Proteins trough a Ca²⁺-requiring, Cyclosporine-Sensitive Pathway. Biochem. Biophys. Res. Comm. 161 (2):619-625.

- Jay,D., Zamorano,R., Muñoz,E., Gleason,R. and Boldu,J. 1991. Study of the Interaction of Cadmium with Membrane-bound Succinate Dehydrogenase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 23 (2):381-389.
- Kinally,K., Antonenko,Y. and Zorov,D.1992. Modulation of Inner Mitochondrial Membrane Channel Activity. *J. Bioenerg. Bioembr.* 24 (1):99-110.
- Kowaltowski,A. and Castilho,R. 1997. Ca^{2+} Acting at the External Side of the Inner Mitochondrial Transition Induced by Phenylarsine Oxide. *Biophys. Biochim. Acta.* 1322:221-229.
- Kowaltowski,A., Vercesi,A. and Castilho,R.1997. Mitochondrial Membrane Protein Thiol Reactivity with NEM or Mersalyl is Modified by Ca^{2+} : Correlation with MTP. *Biochim. Biophys. Acta.* 1318:395-402.
- Kroemer,G.,Zamzami,N. and Susin,S.1997. Mitochondrial Control of Apoptosis. *Immun. Today.* 18 (1):44-51.
- Lapidus,R. and Sokolove,P.1994. The Mitochondrial Permeability Transition. Interactions of Spermine, ADP, and Inorganic Phosphate. *J. Biol. Chem.* 269 (29):18931-18936.
- Le Quoc, K., and Le Quoc, D.1985. Crucial Role of Sulfhydryl Groups in the Mitochondrial Inner Membrane Structure. *J. Biol. Chem.* 260 (13):7422-7428.
- Le Quoc,K. and Le Quoc,D. 1988. Involvement of the ADP/ATP Carrier in Calcium-Induced Perturbations of the Mitochondrial Inner Membrane Permeability: Importance of the Nucleotide Binding site. *Arch. Biochem. Biophys.* 265:249-257.

- Lenartowicz,E , Bernardi,P and Azzone,G.1991 Phenylarsine Oxide Induces the Cyclosporin A.sensitive Membrane Permeability Transition in Rat Liver Mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 23 (4):679-688.
- Macedo,D., Ferraz, V., Pereira da-Silva, L. and Vercesi,A.1988. In *Integration of Mitochondrial Function*, Lemasters,J., Hackenbrock,C., Thurman, R., and Westerhoff,H, eds, Plenum Press, New York. pp.535-542.
- Majima,E., Shinohara,Y., Yamaguchi,N., Hong,Y. and Terada,H.1994. Importance of Loops of Mitochondrial ADP/ATP Carrier for its Transport Activity Deduced from Reactivities of Cysteine Residues with the Sulfhydryl Reagent Eosin-5-maleimide.*Biochem.* 33:9530-9536.
- Massari,S. and Azzone,G.1972. The Equivalent Pore Radius of Intact and Damaged Mitochondria and the Mechanism of Active Shrinkage. *Biochim. Biophys. Acta.* 283 (1):23-29.
- McEnery,M. 1992. The Mitochondrial Benzodiazepine Receptor: Evidence for Association with the Voltage-dependent Anion Channel (VDAC). *J. Bioenerg. Biomembr.* 24:63-69.
- Nicchitta,C. and Williamson,J. 1984.Spermine. A Regulator of Mitochondrial Calcium Cycling. *J. Biol. Chem.* 259 (21):12978-12983.
- Nicolli, A., Petronilli, V. and Bernardi, P.1993. Modulation of the Mitochondrial Cyclosporin A-Sensitive Permeability Transition Pore by Matrix pH. *Biochem.* 32 (16):4461-4465.
- Novgorodov,S., Kultayeva,V., Yaguzhinski,L. and Lemeshko,V. 1987. Ion Permeability Induction by the SH Cross-linking Reagents in Rat Liver Mitochondria is

- Inhibited by the Free Radical Scavenger Butylhydroxytoluene. *J. Bioenerg. Biomembr.* 19:191-202.
- Novgorodov, S. and Gudz, T. 1996. Permeability Transition Pore of the Inner Mitochondrial Membrane Can Operate in Two Open States with Different Selectivities. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28 (2):139-156.
 - Panov, A., Filippova, S. and Lyakhovich, V. 1980. Adenine Nucleotide Translocase as a Site of Regulation by ADP of The Rat Liver Mitochondria Permeability to H⁺ and K⁺ ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 199 (2):420-426.
 - Petronilli, V., Cola, C. and Bernardi, P. 1993. Modulation of Mitochondrial Cyclosporin A-sensitive Permeability Transition Pore. *J. Biol. Chem.* 268:1011-1016.
 - Petronilli, V., Costantini, P., Scorrano, L., Colonna, R., Passamonti, S. and Bernardi, P. 1994. The Mitochondrial Permeability Pore is Subject to Regulation by a Thiol-dependent Voltage Sensor. *J. Biol. Chem.* 269 (24):16638-16642.
 - Qian, T., Nieminen, A., Herman, B. and Lemasters, J. 1997. *Am. J. Physiol.* 273 (6) (Pt1):C1793-1792.
 - Rasheed, K., Diwan, J. and Sanadi, D. 1984. Activation of Potassium Ion Transport in Mitochondria by Cadmium Ion. *Eur. J. Biochem.* 144:643-647.
 - Reed, K. and Bygrave, F. 1974. The Inhibition of Mitochondrial Calcium Transport by Lanthanides and Ruthenium Red. *Biochem. J.* 140:143-155.
 - Richter, C. 1993. Prooxidants and Mitochondrial Ca²⁺: Their Relationship to Apoptosis and Oncogenesis. *FEBS Letters.* 325 (1-2):104-107.

- ESTA TITULO NO DEBE
SALIR
- Rigobello,R., Turcato,F. and Bindoli,A. 1995. Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition by Respiratory Substrates. Arch. Biochem. Biophys. 319 (1):225-230.
 - Sanadi,D., Hughes,J. and Joshi, S. 1981. Activation of Potassium-dependent H⁺ Efflux from Mitochondria by Cadmium and Phenylarsine Oxide. J. Bioenerg. Biomembr. 13 (5-6):425-431.
 - Schmid,P., Pfeiffer,D. and Schmid,H. 1981. Quantification of Lysophosphatidylethanolamine in nanomole Range. J. Lipid. Res. 22 (5):882-886.
 - Shey-Shing,S., and Mei-Jie,J. 1994. Mitochondrial Free Ca²⁺ Concentration in Living Cells. J. Bioenerg. Biomembr. 26 (5):487-493.
 - Tashmukhamedov,B., Gagelgans,A., Mamatkulov, K. and Makhmudova,E. 1972. Inhibition of Ca²⁺ Transport in Mitochondria by Selective Blockade of Membrane Mucopolysaccharides by Hexamine Cobaltchloride. FEBS Letters. 28 (2):239-242.
 - Valle, V., Fagian,M., Perentoni,L., Meinicke,A. and Vercesi,A. 1993. The Participation of Reactive Oxygen Species and Protein Thiols in the Mechanism of Mitochondrial Membrane Permeabilization by Ca²⁺ plus Prooxidants. Arch. Biochem. Biophys. 307 (1):1-7.
 - Vercesi,A. 1984. Possible Participation of Membrane Thiol Groups on the Mechanism of NAD(P)⁺-Stimulated Ca²⁺ efflux from Mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Comm. 119 (1):305-310.
 - Vignais,P. and Vignais,P. 1972. Effect of SH Reagents on Atractyloside Binding to Mitochondria and ADP Translocation. Potentiation by ADP and its Prevention by Uncoupler FCCP. FEBS Letters. 26 (1):27-31.

- Voet,D. and Voet,J. 1995 Biochemistry. John Wiley and Sons, INC. 2nd edition. pp.563-598.
- Wenger,R. 1989. Pharmacology of Cyclosporin (Sandimmune). *Pharmacol. Rev.* 41:243-247.
- Whittaker,P. and Danks,S. 1978. Mitochondria: Estructura, Función y Formación. Editorial Continental,S.A. México. 173pp.
- Wingrove,D. and Gunter,T.1986. Kinetics of Mitochondrial Calcium Transport.I. Characteristics of the Sodium-independent Calcium Efflux Mechanism in Liver Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 261 (32):15159-15165.
- Wolkowicz,P., Michael,L., Lewis,R. and McMillin-Wood,J. 1983. Sodium-Calcium Exchange in Dog Heart Mitochondria: Effects of Ischemia and Verapamil. *Am. J. Physiol.* 244 (5):H644-651.
- Ying,W., Emerson,V., Clarke,M. and Sanadi,R. 1991. Inhibition of Mitochondrial Calcium Ion Transport by an Oxo-bridged Dinuclear Ruthenium Ammine Complex. *Biochem.* 30 (20):4942-4952.
- Zalman,L., Nikaido,H. and Kagawa,Y. 1980. Mitochondrial Outer Membrane Contains a Protein Producing Nonspecific Diffusion Channels. *J. Biochem.* 255:1771-1774.
- Zazueta,C., Reyes-Vivas,H., Zafra,G., Sánchez,C., Vera,G. and Chávez,E. 1998. Mitochondrial Permeability Transition as Induced by Cross-linking of Adenine Nucleotide Translocase. *Biochem. & Cell Biol.* 30 (4):517-527.
- Zoratti,M. and Szabó,I. 1995. The Mitochondrial Permeability Transition. *Biochim. Biophys. Acta.* 124:139-176.

- Zwinsky,C. and Schmid,H. 1992. Peroxidative Damage to Cardiac Mitochondria: Identification and Purification of Modified Adenine Nucleotide Translocase. Arch. Biochem. Biophys. 294 (1):178-183.