

40

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

*"Inhibición Del Transporte De Calcio
Mitocondrial Por Análogos Del Rojo De Rutenio"*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
B I O L O G O

PRESENTA:

Francisco Correa Segura

Director de Tesis : Dra. Cecilia Zazueta Mendizábal



MÉXICO, D.F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A LAS DOS PERSONAS MÁS IMPORTANTES EN
MI VIDA, A QUIENES ADMIRO Y AMO
PROFUNDAMENTE: MIS PADRES. FRANCISCO Y
LOURDES... LOS QUIERO CON TODO MI
CORAZÓN

HEBIS CON
FALLA DE ORIGEN

Te doy gracias Señor todo poderoso tu eres el que es y ha sido siempre...

Con mucho cariño a: Porfiria Soto , Epifanio Correa, Florencio Segura y Evella magaña. Abuelitos lindos un beso y un abrazo donde quiera que se encuentren.

A mis súper hermanos: **Lulú, Julio y Violeta**. Gracias por estar justo en el momento mas indicado, los llevo siempre en mi corazón. A los gumis (Sergio y Luis) con todo mi cariño, de ustedes he aprendido el valor de una sonrisa.

A la familia segura: tía Licha , tío Chuchin, tío Hugo ,tía Bertha, tío Chore. De usted aprendí el camino de Dios y por sus incomparables consejos. A mis primos Fernanda, Jesús Manuel y Andrea, gracias por todas aventuras inolvidables que hemos compartido.

A todos mis amigos... ustedes saben quienes son, gracias por estar siempre conmigo, por su apoyo incondicional y por todo lo que he aprendido de ustedes.

A steeby, suker, camila, watson, boby: gracias por su compañía.

Finalmente a todos los que preguntaron ¿ ...y la tesis? Aquí está.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos:

A mis papas : Francisco y Lourdes, a mis hermanos: Lulú , Violeta Y Julio, a mis sobrinos: Sergio y Luis. Los quiero mucho.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de estudios superiores IZTACALA : a quien le debo lo que soy.

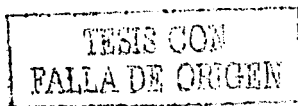
A la Jefatura de biología : por todas las facilidades otorgadas.

A cada uno de los miembros del jurado: sus observaciones enriquecieron grandemente este trabajo

Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal : por su incomparable paciencia , comprensión y por hacer de esto mi forma de vida , de verdad muchas gracias, así mismo al Dr. Edmundo Chávez .

Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología por la oportunidad de formar parte de el, así como intuirme durante todo este tiempo finalmente a cada uno de los integrantes del mismo, especialmente a: Noemí , Ceci Zazueta, Marcela, Norma, Sandra, Raimundo, Ricardo, David, , César , Oscar y Raúl.

Y a todo aquel que lea mas allá de los agradecimientos...



Contenido

	Paginas
Abreviaturas	3
Resumen	4
Introducción.	5
Importancia del calcio en el metabolismo celular.	6
Captación de calcio y daño mitocondrial	9
Regulación de la concentración de Ca^{2+} en la Mitocondria.	15
Características del Sistema de Captación de Ca^{2+} Mitocondrial.	16
Características Cinéticas del Uniportador Mitocondrial del Ca^{2+} .	19
Dependencia de la entrada de Ca^{2+} a la temperatura.	20
Inhibición de la entrada de Ca^{2+} .	21
Objetivos.	28
Material y Métodos.	29
Preparación de mitocondrias.	
Preparación de fracciones mitocondriales.	30
Citocromo oxidasa.	31
Acumulación de calcio	32

Síntesis de análogos del rojo de rutenio.	33
- con fenantrolinas.	
- rutenio 360.	34
Resultados y Discusión	34
Conclusión	55
Bibliografía	56

Abreviaciones.

ADP: adenosin-5' difosfato

ATP: adenosin-5' trifosfato

BSA: albúmina sérica de bovino

CCCP: carbinilcianuro-m-cloro-fenilhidrazona

EDTA: etilidamina tetracético

HCl: ácido clorhídrico

HEPES: (N-[hidroxietil] piperacina-N'-[2-etanosulfónico])

KCl: cloruro de potasio

Log : logaritmo base 10

R R : rojo de rutenio

Ru 360: rutenio 360

Ru Phen: rutenio O-fenantrolina

TRIS: [tris (hidroximetil) aminometano]

UV : luz ultravioleta

Resumen:

Se sabe que la estimulación de la respiración mitocondrial es inducida por la inhibición del transporte de calcio mitocondrial en presencia del complejo binuclear de rutenio (Ru 360), presente en las muestras comerciales del inhibidor clásico del transporte rojo de rutenio (Ying 1991). En este trabajo se muestra que Ru 360 es el compuesto mas potente y específico para la inhibición del transporte de calcio mitocondrial, se describe también los mecanismo por los cuales el Ru 360, así como los análogos de rutenio, inhiben el transporte de calcio. Se evaluó el tipo de inhibición que ejercen los análogos de rutenio así como la del rojo de rutenio, siendo para el Ru 360 de tipo no competitivo con una KI 9.89 nM. El número específico de sitios de unión fue de 6.2 pmol / mg de proteína mitocondrial. El rojo de rutenio y el Ru 360 son inhibidores mutuamente excluyentes. La unión de lantano no fue desplazada por la presencia de Ru 360 en el medio. El Ru Phen fue el compuesto menos efectivo para la inhibición del transporte de calcio mitocondrial. Los resultados sugieren que los complejos de rutenio se pueden estar uniendo a través de las regiones negativas de los fosfolípidos de la membrana, específicamente , aquellos que se encuentran adyacentes al uniportador de calcio mitocondrial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

Las proteínas son las macromoléculas biológicas que poseen las propiedades fisicoquímicas mejor definidas y por tanto, el papel central que juegan en los procesos biológicos ha sido reconocido desde los inicios de la bioquímica.

Las proteínas pueden realizar una gran cantidad de funciones dentro de la célula, gracias a la capacidad que poseen para plegarse en estructuras tridimensionales muy diversas. Tales funciones abarcan la diferenciación celular, estructura y soporte y una de las más relevantes consiste en transportar solutos a través de las membranas. Las células están separadas del medio que las rodea por membranas plasmáticas. Las células eucariontes, además están compartimentalizadas por membranas intracelulares que forman los límites de las estructuras internas de varios organelos. Los núcleos apolares de las membranas biológicas las hacen altamente impermeables a la mayoría de sustancias iónicas y polares, por lo cual la célula o el organelo tiene que ayudarse de proteínas altamente especializadas, llamadas proteínas de transporte, para permitir el intercambio iónico transmembranal.

Importancia del calcio en el metabolismo celular

El calcio es un elemento esencial que participa en diversas funciones:

- A) Parte estructural de los huesos de vertebrados,
- B) Interviene en los procesos de regulación de la contracción muscular,
- C) Interviene en la regulación de la secreción,
- D) Interviene en la transmisión de impulsos nerviosos,
- E) Mantiene la presión osmótica a niveles fisiológicos,
- F) Es esencial para el movimiento del citoesqueleto,
- G) Se requiere en la cascada de la regulación sanguínea
- H) Actúa en una gran cantidad de procesos enzimáticos como segundo mensajero,
- I) Interviene en el proceso de fotosíntesis,
- J) Es cofactor enzimático.
- K) Participa en muchas de las actividades de adhesión entre células,
- L) Interviene en el proceso de apoptosis o muerte celular programada,
- M) Participa en el sistema inmune para que éste lleve a cabo sus funciones de defensa,

N) Su presencia es indispensable en los procesos celulares más generales, como son la motilidad, el crecimiento y la división celular, entre muchos,

O) Es un importante activador del metabolismo oxidativo y

P) Participa en la regulación de vías metabólicas.

Las concentraciones de calcio son estrictamente controladas dentro de la célula así como en los fluidos extracelulares.

En condiciones de reposo, la concentración de Ca^{+2} en la célula se mantiene en un nivel bajo, aproximadamente 10^{-7} M contra un gradiente de 10^{-5} M (aunque se cree que este valor no es constante entre los diferentes tipos celulares, debido a la diversidad de funciones). Cuando la célula es estimulada, por ejemplo durante la contracción muscular, se produce una entrada de Ca^{+2} a través de la membrana plasmática y aumenta la concentración intracelular. Los iones de Ca^{+2} entonces se encuentran en un estado de constante flujo entre los diferentes compartimentos celulares y hasta entre las células. Si la concentración de Ca^{+2} alcanza un valor de 10^{-5} M, la destrucción de la célula comienza, al activarse de inmediato proteasas internas.

A partir de 1970 se reconoció al calcio como segundo mensajero intracelular y más adelante, se concluyó que actúa principalmente a través de proteínas que tienen la capacidad de unirlo.

El Ca^{+2} es un catión no polarizable que tiene gran afinidad por ligandos de tipo oxo. Las proteínas que unen al calcio poseen muchos aminoácidos que tienen funciones de carboxilato, como los ácidos aspártico y glutámico.

En todos los casos, la estricta regulación de las concentraciones de calcio entre los diversos compartimentos celulares, es indispensable para que su función se lleve a cabo satisfactoriamente.

El calcio se encuentra en reservas específicas entre los distintos compartimentos celulares. El citoplasma, la mitocondria, el retículo endoplásmico, el núcleo y el aparato de Golgi cuentan con sus propias reservas de calcio que se mantienen en equilibrio gracias a finos sistemas de transporte. Se ha sugerido que una de las más importantes funciones de la mitocondria consiste en mantener normales los niveles de calcio en los distintos compartimentos para de esa forma asegurar el buen funcionamiento de la célula.

Regulación de la concentración de Ca^{+2} en la Mitocondria.

La mitocondria es el lugar donde se lleva a cabo el metabolismo oxidativo eucarionte. Contiene, como Albert Lehninger y Eugene Kennedy demostraron en 1948, las enzimas que median este proceso, incluyendo a la piruvato deshidrogenasa, a las enzimas del ciclo del ácido cítrico, las enzimas que catalizan la oxidación de los ácidos grasos y las enzimas y proteínas redox implicadas en el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa. Es pues, con razón que se describe a la mitocondria como la central "productora de energía" de la célula.

La membrana interna de la mitocondria, presenta una gran cantidad de invaginaciones denominadas crestas. Su número varía con la actividad respiratoria del tipo particular de célula. Ello se debe a que las proteínas que median el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa están unidas a la membrana mitocondrial interna, de modo que la velocidad de respiración varía con el área de la superficie de la membrana. El hígado por ejemplo, que tiene una velocidad de respiración mas o menos baja, contiene mitocondrias con pocas crestas, mientras que las mitocondrias del músculo cardiaco contienen muchas más. No obstante, el área total de la membrana mitocondrial interna en una célula hepática es aproximadamente unas 15 veces mayor que la de su membrana externa. El compartimiento mitocondrial interno, denominado matriz consiste, en una sustancia de apariencia gelatinosa con menos de

50% de agua, contiene concentraciones notablemente elevadas de enzimas solubles del metabolismo oxidativo, así como sustratos, cofactores nucleotídicos e iones inorgánicos.

La matriz contiene también la maquinaria genética mitocondrial (DNA, RNA y ribosomas-) que genera algunas proteínas mitocondriales .

La membrana mitocondrial externa contiene porina, una proteína que forma poros no específicos, que permiten la libre difusión de moléculas de hasta 10kDa.

La membrana interna que contiene aproximadamente 75% en peso de proteínas, es considerablemente más rica en proteínas que la membrana externa. Es completamente permeable al O_2 , CO_2 y H_2O y contiene, además de las proteínas de la cadena respiratoria , numerosos proteínas de transporte que controlan el paso de metabolitos como ATP, ADP, piruvato , Ca^{+2} y fosfato. Esta impermeabilidad controlada de la membrana mitocondrial interna a la mayoría de los iones, metabolitos y compuestos de masa molecular pequeña , permite la generación de gradientes iónicos a través de esta barrera y da lugar a la división en compartimentos de funciones metabólicas entre el citosol y la mitocondria. Los tres principales fosfolípidos constituyentes de la membrana interna de la mitocondria son : cardiolipina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

La concentración de Ca^{2+} dentro de la mitocondria es regulada por 3 mecanismos independientes. La entrada de Ca^{2+} se efectúa a través de un uniportador rápido, y la salida involucra 2 procesos que pueden depender o no de la presencia de Na^+ en el medio. Además, existe un cuarto mecanismo que permite la liberación de grandes cantidades de Ca^{2+} , a través de un poro inespecífico que se forma en la membrana interna en respuesta a varios agentes. **Figura 1** (Gunter y Pfeiffer, 1990).

La principal función de los sistemas transportadores de Ca^{2+} en la mitocondria consiste en regular la concentración de este ión dentro de la matriz; debido a que la concentración de Ca^{2+} libre afecta directamente la velocidad de flujo de la vía de la fosforilación oxidativa. La velocidad de síntesis de ATP varía en presencia de concentraciones de Ca^{2+} entre $0.1 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$, mismo intervalo en el que puede variar la concentración de este ión en respuesta a estímulos hormonales o eléctricos en condiciones fisiológicas (Denton 1980; Hansford 1985; Brand y Murphy 1987). Algunas hormonas, como el glucagon y la vasopresina, así como algunos agonistas α -adrenérgicos, pueden aumentar la concentración citoplasmática de Ca^{2+} de $0.1 \mu\text{M}$ hasta $0.5 - 1 \mu\text{M}$ (Marban y Rink, 1980; Hoek, 1992), y esto puede traducirse en un incremento en la concentración intramitocondrial de Ca^{2+} (Moreno-Sánchez y Hansford, 1988) que activa la deshidrogenación de sustratos, por lo que se ha propuesto al Ca^{2+} como

un regulador de la velocidad de síntesis de ATP mitocondrial in vivo
 (Hansford, 1985; MacCormack y cols, 1990)

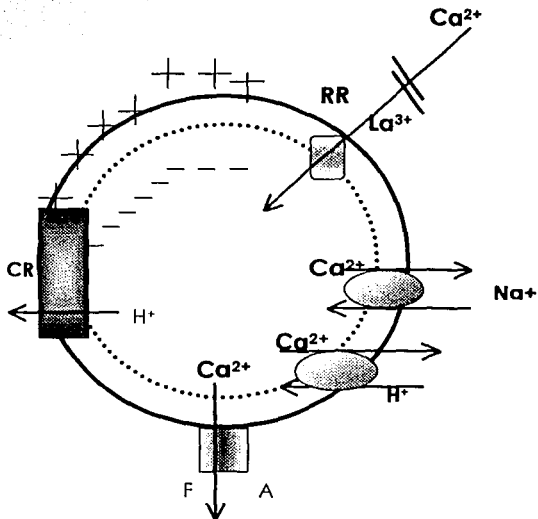


Figura 1. Transporte de Ca^{2+} a través de la membrana interna mitocondrial. La entrada de Ca^{2+} a la mitocondria se lleva a cabo por medio de un uniporador dependiente del potencial eléctrico transmembranal mantenido por el bombeo de protones a través de los complejos respiratorios (CR). Este transporte es inhibido por rojo de rutenio (RR), Mg^{2+} y La^{3+} . La salida de Ca^{2+} se efectúa en intercambio con Na^+ o H^+ , y a través de un poro inespecífico que se forma en la membrana interna mitocondrial cuando la concentración de Ca^{2+} es elevada y están presentes ciertos agentes como el fosfato (F) o el arsenato (A)

Tabla 1. Sistemas enzimáticos mitocondriales regulados por Ca^{2+} . Tomada de Moreno - Sánchez y Hansford 1982.

ACTIVACIÓN	Localización	$K_{0.5}$ (μM)	para Ca^{2+}	Referencias
Glicerol-1-Pi Deshidrogenasa	Cara externa de la membrana mitocondrial		0.6	Wernette y cols., 1981
Piruvato Deshidrogenasa Fosfatasa	Matriz mitocondrial		1.08	MacCormack y Denton, 1980
Isocitrato Deshidrogenasa	Matriz mitocondrial		1.19	Denton y cols., 1978
Oxoglutarato Deshidrogenasa	Matriz mitocondrial		1.03	MacCormack y Denton, 1979
Succinato deshidrogenasa	Cara interna de la membrana interna mitocondrial		1.3	Ezawa y Ogata, 1979
INHIBICIÓN				
Piruvato Carboxilasa	Matriz mitocondrial		10-25nmol/mg	Foldes y Barrit, 1977
Piruvato Deshidrogenasa Cinasa	Matriz mitocondrial		0.01-0.5	Cooper y cols., 1974
Carbamil fosfato sintetasa	Matriz mitocondrial		10-15nmolmg	Meijer y cols., 1981

Varios sistemas enzimáticos mitocondriales son activados o inhibidos por la presencia de Ca^{2+} . La tabla 1 muestra las concentraciones de Ca^{2+} libre necesarias para obtener la mitad del efecto máximo sobre la enzima ($K_{0.5}$ para Ca^{2+}).

El Ca^{2+} ejerce su efecto activador a través de una disminución de la K_m para el sustrato de las enzimas, teniendo un pequeño o nulo efecto sobre la V_{max} . En la oxoglutarato deshidrogenasa, la K_m para oxoglutarato cambia de 2.5 mM a 0.31 mM con 1.9 μM de Ca^{2+} (MacComak y Denton, 1979). La piruvato deshidrogenasa cinasa es inhibida de un modo no competitivo por el calcio, la V_{max} disminuye un 55% con 7 μM de Ca^{2+} (Cooper y cols., 1974); otras enzimas son afectadas por concentraciones de Ca^{2+} algo mayores, como es el caso de la Isocitrato deshidrogenasa, cuya K_m disminuye de 0.28 mM a 0.5 μM , con 28 μM de Ca^{2+} (Denton y cols., 1992); la NADH ubiquinona reductasa ($K_{0.5}=5.7\text{-}6\text{mM}$) (Kottlyat y cols., 1992). La piruvato carboxilasa y el transportador de piruvato (que son sensibles a concentraciones de Ca^{2+} entre 10 y 100 mM) (Folders y Barit, 1997).

Además de las deshidrogenasas mencionadas, se ha sugerido que ciertos componentes de la cadena respiratoria son regulados por Ca^{2+} , como el complejo bc1 mitocondrial (Murphy y cols., 1990), (Folders y Barit, 1997) ya que se ha observado que el Ca^{2+} es capaz de aumentar el flujo fosforilante en presencia de succinato y rotenona, o con NADH a

concentraciones saturantes (Doussiere y cols., 1984) se ha reportado que algunos transportadores, como el acarreador de adenín nucleótidos también podrían ser regulados por la concentración de calcio mitocondrial.

Captación de Ca^{2+} y Daño Mitocondrial

La mitocondria es el organelo con la mayor capacidad de acumulación de Ca^{2+} , pudiendo acumular más de 2 mol/mg. Debido a esto, algunos investigadores han sugerido que la mitocondria funciona en condiciones fisiológicas como regulador de la concentración citoplásmica de Ca^{2+} (Nicholls y Crompton, 1980; Nicholls y Scott, 1980). La velocidad de salida de Ca^{2+} se mantiene esencialmente constante una vez que se han acumulado 10 nmol de Ca^{2+} /mg, mientras que la actividad de la vía de entrada de Ca^{2+} es altamente dependiente de la concentración de Ca^{2+} externo; si la entrada es lo suficientemente rápida para contrarrestar los efectos del sistema de salida, se producirá una acumulación neta del catión. En esta situación, llamada acumulación masiva, el Ca^{2+} puede precipitarse en la matriz mitocondrial en forma de fosfato de calcio, formando gránulos de hidroxapatita.

Suspensiones de mitocondrias aisladas son capaces de disminuir la concentración de Ca^{2+} extramitocondrial hasta $0.1 \mu\text{M}$; en este estado estacionario la entrada de Ca^{2+} a través del uniportador es equilibrado por la salida de Ca^{2+} (Puskin y cols., 1976). Esta acumulación masiva ha sido observada en condiciones patológicas como la necrosis coagulativa (Farber, 1981; Farber 1982), en las que las células están expuestas a daños en sus estructuras por altas concentraciones de Ca^{2+} .

Una concentración de Ca^{2+} de más de $100 \mu\text{M}$ puede dañar la estructura de los ácidos nucleicos y de algunas proteínas (Farber, 1990; Nicolera y cols., 1990; Reed, 1990). Aún concentraciones menores de este ión interfieren con cinasas dependientes de Mg-ATP (Blackshear y cols., 1988) además de producir una activación de proteasas y fosfolipasas sensibles a Ca^{2+} .

Características del Sistema de Captación de Ca^{2+} Mitocondrial

Vasington y Murphy (1962) descubrieron que la mitocondria es capaz de acumular Ca^{2+} . La captación está asociada a la respiración y a la hidrólisis de ATP, pudiéndose captar este catión incluso en contra de su gradiente. Los inhibidores de la cadena respiratoria inhiben la entrada de Ca^{2+} cuando el potencial transmembranal se sostiene por la oxidación de sustratos, mientras que en presencia de ATP el transporte es inhibido por

oligomicina, un inhibidor de la ATPasa mitocondrial (Lehninger y cols., 1967). En presencia de Pi y ADP la mitocondria es capaz de acumular hasta 3 μmol de Ca^{2+} por mg de proteina (Scarpa y Azzone, 1970); debido a estas observaciones se dedujo que era un proceso activo (Chance, 1965). El transporte de Ca^{2+} también se promueve por la salida de K^+ inducida por valinomina (Scarpa y Azzone, 1970). Todas estas evidencias indican que la entrada de Ca^{2+} depende de la energía del potencial transmembranal; es decir, el mecanismo de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria es un proceso secundario dependiente de la respiración o de la hidrólisis de ATP.

Las mitocondrias de todos los vertebrados y de muchos invertebrados estudiadas son capaces de transportar Ca^{2+} (Bygrave, 1977; Lehninger y cols., 1967); este transporte se manifiesta en ciertas especies desde las etapas embrionarias (Bygrave y Ash, 1997).

En condiciones cercanas a las fisiológicas la cantidad de Ca^{2+} que se acumula es mucho menor a 3 $\mu\text{M}/\text{mg}$; alrededor de 50 nmol de Ca^{2+} en ausencia de Pi, o de 100-200 nmol/mg en presencia Pi. En estas condiciones las funciones mitocondriales no se alteran (Slater y Cleland, 1953; Brierley y cols., 1964).

Varios cationes son transportados a la matriz mitocondrial a través de este acarreador. La selectividad del transporte es la siguiente: $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ (Drahota y cols., 1969; Vainio y cols., 1970; Reed y Bygrave, 1974). También son transportados Fe, Pb y lantánidos (Kapoor y cols., 1985; Reed

y Bygrave, 1974; Vainio y cols., 1970). En mitocondrias de corazón, el transporte de Mg^{2+} , ocurre por un transportador diferente al acarreador de Ca^{2+} (Brierley y cols., 1987; Crompton y cols., 1976; Diwan, 1987), mientras que en las de cerebro e hígado los Inhibidores del transporte de Ca^{2+} inhiben también el transporte de Mg^{2+} (Rugolo y Zoccarato, 1984; Kun, 1976). El transportador de Ca^{2+} tiene baja actividad de transporte de Mg^{2+} (Chapell y cols., 1963, Vainio y cols., 1970); sin embargo, la completa exclusión del transporte de Mg^{2+} a través del acarreador de Ca^{2+} parece ser tejido específica.

Existen evidencias de que la entrada de Ca^{2+} no se efectúa en intercambio con ningún otro ión (Lehninger y cols., 1967; Rottenberg y Scarpa., 1974; Scarpa y Asoné., 1970). La entrada de Ca^{2+} a la mitocondria ocurre a favor su gradiente electroquímico, como se esperaría para un uniporador, siguiendo la relación,

$$\Delta\mu_{Ca^{2+}} = RT \ln \frac{[Ca^{2+}]_f}{[Ca^{2+}]_d} + 2F(\phi_f - \phi_d)$$

donde $\Delta\mu_{Ca^{2+}}$ es el potencial electroquímico transmembranal de Ca^{2+} , R es la constante de los gases, T es la temperatura, $[Ca^{2+}]_f$ es la concentración de Ca^{2+} fuera de la mitocondria, $[Ca^{2+}]_d$ es la concentración de Ca^{2+} dentro de la mitocondria, F es la constante de Faraday y ϕ_f y ϕ_d corresponden al potencial eléctrico transmembranal fuera y dentro de la mitocondria, respectivamente.

Características Cinéticas del Uniportador Mitocondrial del Ca^{2+}

El uniportador de Ca^{2+} presenta alta afinidad por este catión. La concentración de Ca^{2+} a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima ($K_{0.5}$) se ha reportado entre 1-189 μM (Akerman, 1977b; Crompton y cols., 1976; Hutson., 1977; Pfeiffer y cols., 1976; Vinogradov y Scarpa, 1973). Los valores de velocidad máxima (V_{max}) en mitocondrias de hígado oscilan entre 700 y 1200 $\text{nmol}/\text{min mg}$ (Bragadin y cols., 1979; Hutson y cols., 1976; Vinogradov y cols., 1973); mientras que en mitocondrias de corazón tienen un valor entre 400 y 1170 $\text{nmol}/\text{min mg}$ (McMillin-Wood y cols., 1980; Vercesi y cols., 1978). Generalmente se dice que el transporte es mayor en hígado que en corazón, pero la velocidad más alta que se ha reportado se midió en mitocondrias de corazón de perro: 1750 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ (McMillin-Wood y cols., 1980). Por otro lado, aún los valores más altos de velocidad reportados resultan subestimados, ya que la velocidad es limitada por el potencial transmembranal.

El transporte de calcio sigue un comportamiento sigmoidal con respecto a la concentración de Ca^{2+} , con un coeficiente de Hill que varía entre 1.7 y 2 (Bragadin y cols., 1979; Bygrave y cols., 1971; Heaton y Nicholls, 1976; Hutson y cols., 1976; Reed y Bygrave, 1975; Scarpa y Graziottli, 1973; Vinogradov y Scarpa, 1973). Sin embargo, otros autores que no observan este fenómeno, sugieren que depende de la temperatura o de la fuerza iónica del medio, así como

de la presencia de Mg^{2+} u otras condiciones (Åkerman, 1977b; Åkerman, 1977; Bragadin y cols., 1979; Crompton y cols., 1976). Una alta concentración de iones impermeables como Mg^{2+} o Li^{2+} , así como bajas temperaturas incrementan la sigmoidicidad del proceso (Bragadin y cols., 1979).

Un coeficiente de Hill de 2 indica que el Ca^{2+} se une al menos a dos sitios en el uniportador, que pueden ser ambos de transporte o bien, uno de ellos de transporte y otro de regulación. Se ha descrito que cuando se unen pequeñas cantidades de Ca^{2+} al uniportador de calcio, la sigmoidicidad del transporte de Mn^{2+} se pierde y su velocidad aumenta, lo cual se explica diciendo que el Ca^{2+} se une a un sitio de activación que disminuye la energía de activación requerida para el transporte, con lo que aumenta la velocidad de transporte de Mn^{2+} (Vinogradov y Scarpa., 1973). La velocidad de disociación de Ca^{2+} de este sitio es lenta, comparada con la velocidad de transporte (Krörner, 1986 y Riley, 1986).

Dependencia de la entrada de Ca^{2+} a la temperatura

La dependencia del transporte de Ca^{2+} a la temperatura puede utilizarse para calcular la energía de activación del proceso si se construye una gráfica de Arrhenius (log de la velocidad vs. $1/T$).

En un medio de sacarosa, utilizando succinato como sustrato, Åkerman (1977) calculó la energía de activación en 40 kJ/mol, y la adición de 2 mM de Mg^{2+} redujo esta energía a 18 kJ/mol, mientras que la adición de 0.4 mM de espermina redujo casi a cero la energía de activación.

Inhibición de la entrada de Ca^{2+}

Los inhibidores del transporte de Ca^{2+} pueden ser de cuatro tipos. Entre los inhibidores competitivos se encuentran los iones que también son transportados a través del uniportador, como el Sr^{2+} , el Mn^{2+} , el Ba^{2+} el Fe^{2+} y los lantánidos. Existe otro grupo de inhibidores que está formado por cationes como el Mg^{2+} , las poliaminas y los protones, que a pesar de no ser transportados por el uniportador, interfieren en el proceso del transporte de Ca^{2+} por unión o por apantallamiento de cargas. El tercer grupo de inhibidores lo componen policationes como el rojo de rutenio y la hexamina de cobalto (Tashmukhamedov y cols., 1972). Estos inhibidores son muy potentes y presentan una baja constante de inhibición (Ki). Finalmente, existen algunos fármacos como los β -bloqueadores (Noak y Greeff, 1971), las guanidinas (Davidoff, 1974) y los diuréticos (Gemba, 1974) que actúan como inhibidores del transporte de Ca^{2+} .

Los lantánidos se transportan muy lentamente a través del uniportador, por lo que pueden ser utilizados como inhibidores competitivos efectivos (Vaino y cols, 1970b). A partir de los datos de inhibición del transporte de Ca^{2+} se ha calculado que existe un máximo de 0.001 nmol/mg de sitios de transporte sensibles a lantano en la membrana interna mitocondrial (Vaino y cols, 1970). Este dato representa uno de los estimados más confiables del número de acarreadores de Ca^{2+} en la mitocondria.

La inhibición del transporte de Ca^{2+} por Mg^{2+} , especialmente en mitocondrias de corazón (Vaino y cols, 1970) se revierte parcialmente por Mn^{2+} (Allshire y cols, 1985). El cadmio es otro catión que inhibe competitivamente el transporte de Ca^{2+} (Chávez y cols, 1985). El efecto del cadmio se previene con diltioleitol, lo cual indica que el cadmio entra a la mitocondria e interactúa con algún grupo sulfhidrilo en la membrana, el cual es esencial para la translocación del Ca^{2+} (Chávez y cols, 1985). Las poliaminas espermina y espermidina, inhiben el transporte de manera similar al Mg^{2+} , con una K_i de 180 μM (Åkerman, 1977; Lenzen y cols, 1992); sin embargo, a bajas concentraciones de Ca^{2+} dichas poliaminas activan el transporte con una $K_{0.5}$ de 50 μM en lugar de inhibirlo (Lenzen y cols, 1992). La inhibición por Mg^{2+} o por poliaminas puede ser debida a la unión de estos

agentes cerca del sitio de transporte o por efectos de apantallamiento de cargas.

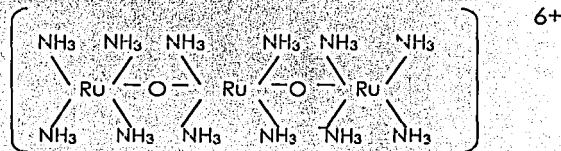
El inhibidor más utilizado en el estudio del transporte de Ca^{2+} mitocondrial ha sido el policalción rojo de rutenio (Rossi y cols., 1973).

El rojo de rutenio es un compuesto inorgánico, producto de la síntesis química en el laboratorio y que no se encuentra en la naturaleza. El rojo de rutenio fue descrito por primera vez por Joly, en 1892 y desde entonces se ha investigado ampliamente con el fin de conocer un poco más de sus propiedades.

La caracterización del rojo de rutenio fue realizada por primera vez por A. Joly en 1892, quien obtuvo la fórmula mínima de este compuesto. Gleu y Breuel (1938) propusieron que el rojo de rutenio es una molécula diamagnética, a diferencia de Morgan y colaboradores (1936) quienes reportaron que el rojo de rutenio era molécula paramagnética.

En 1961 Fletcher y colaboradores propusieron acertadamente que se trataba de un complejo iónico polinuclear, que estaba constituido por tres rutenios de valencia $3+$ y $4+$ unidos mediante puentes oxo y hexacoordinados con grupos amino, además de poseer cloruros como cationes. Fletcher y colaboradores se interesaron en este compuesto porque observaron que el diamagnetismo y la intensa coloración de muchos compuestos de rutenio se debía a su naturaleza polinuclear. También demostraron que el comportamiento de este compuesto era

típico para un complejo polinuclear (trinuclear) de rutenio. Demostraron que en la estructura metálica de este compuesto no se encontraban halógenos coordinados. Midiéron la liberación de amoniaco, cuando este compuesto se sometió a un proceso de calentamiento. Encontraron que, coordinados a los tres átomos de rutenio, se encontraban 14 átomos de nitrógeno. Con estos resultados los autores pudieron establecer la primera fórmula estructural del rojo de rutenio, donde los átomos de rutenio se encuentran entrelazados mediante dos puentes oxo:



Fletcher y colaboradores también determinaron la fórmula mínima para el rojo de rutenio: $[\text{Ru}_3 \text{O}_2 (\text{NH}_3)_{14}] \text{Cl}_6$, con un peso molecular de 786.36 g/mol y le asignaron una valencia de 6+.

Las propiedades de oxido-reducción del rojo de rutenio son ampliamente conocidas. Se sabe que el rojo de rutenio (catión) se oxida fácilmente a café de rutenio. También se ha determinado que la oxidación del rojo de rutenio en HCl 0.1 N es de un 20% después de 24 hrs, y que conforme se aumenta la concentración de HCl, el porcentaje de oxidación es significativamente más rápido.

Debido a que el rojo de rutenio y sus análogos (café de rutenio, violeta de rutenio) son altamente coloridos, la medición espectrofotométrica en la región visible y en UV, arroja importantes datos sobre su estructura, su pureza y reactividad química.

En cuanto a su espectro en la región UV y visible, el rojo de rutenio muestra propiedades singulares. Por ejemplo, presentan altos coeficientes de extinción atribuido principalmente a su naturaleza polinuclear.

Es bien conocida la inestabilidad que el rojo de rutenio presenta en solución (Joly, 1978), por lo cual se recomienda el uso de soluciones de acetato de amonio pH7.0, como disolvente para realizar las mediciones espectrofotométricas, en la cual el rojo de rutenio y sus análogos se mantienen estables por mucho tiempo.

Se ha determinado que el rojo de rutenio es más estable en soluciones ácidas, como por ejemplo en ácido acético; sin embargo, a pH's menores, como los generados por los ácidos minerales, el rojo de rutenio es casi instantáneamente oxidado a café de rutenio.

La espectrofotometría de absorción electrónica ha permitido establecer claras diferencias entre el rojo, café y violeta de rutenio (Figura 2).

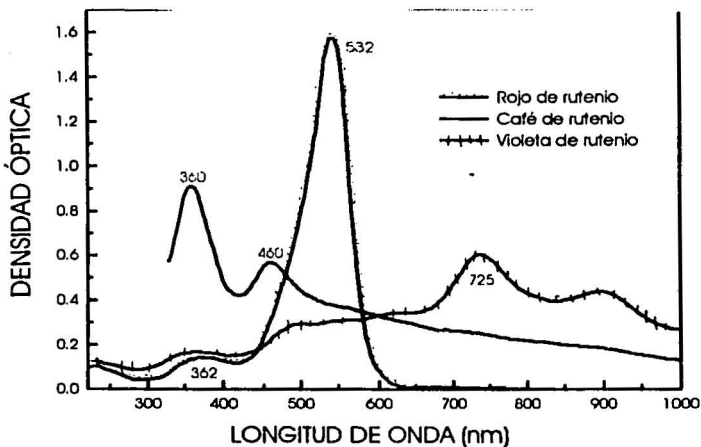


Figura 2. Espectro de absorción del rojo de rutenio y sus análogos.

El valor reportado del coeficiente de extinción molar máximo de absorción del rojo de rutenio puro, se encuentra alrededor de 21,000 mol/L.cm en soluciones acuosas, mientras que es ligeramente mayor en soluciones de acetato de amonio (22,700 mol/L.cm)

Por mucho tiempo se creyó que el rojo de rutenio era un colorante selectivo para mucopolisacáridos. Sin embargo Luft H (1971), demostró que el rojo de rutenio se une a una gran cantidad de macromoléculas, incluyendo al DNA, al ácido péptico, pectinas, heparina, ácido poliacrílico, agar, gel, moco nasal, RNA de levaduras y en general a los derivados de la celulosa.

Además, se ha demostrado que el rojo de rutenio interviene en la transferencia de electrones a la membrana interna mitocondrial, a nivel ya sea del citocromo c o de la citocromo oxidasa (Luff, 1971).

Dada la importancia que tiene el proceso de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria para la transducción de energía celular, es perfectamente justificable la caracterización cinética, así como la purificación de la proteína responsable de este sistema de transporte, con el fin de entender su funcionamiento y regulación.

A pesar de la información que se tiene sobre el poder inhibitorio del rojo de rutenio, es importante poner en claro el papel que juegan otros inhibidores como el rutenio 360 y el rutenio coordinado con fenantrolina para encontrar aquel que presente el mayor grado de especificidad hacia el uniportador de calcio mitocondrial y poder establecer el mecanismo de acción de estos inhibidores. Estos datos podrían ayudar a entender el funcionamiento y la regulación del sistema de transporte de calcio mitocondrial.

De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos .

OBJETIVOS:

Establecer los mecanismos de inhibición del Ru360 y rutenio O-fenantrolina en el transporte de calcio mitocondrial y compararlos con el inhibidor clásico rojo de rutenio

Determinar el grado de competencia entre los inhibidores

Proponer un posible mecanismo de acción de los inhibidores policatiónicos del transporte de entrada de calcio mitocondrial, comparando la efectividad y sitios de unión de estos inhibidores

MATERIAL Y MÉTODOS

PREPARACION DE MITOCONDRIAS: Para la obtención de mitocondrias se utilizaron riñones de ratas wistar de 250 g, que se depositaron en un medio frío de sacarosa 250 mM, TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.3. Con este mismo medio se lavaron para eliminar tejido membranoso y/o graso, posteriormente se cortaron en pequeños trozos y se homogenizaron. El homogenado se centrifugó a 2 500 rpm durante 10 min donde se recuperó el sobrenadante, éste fue nuevamente centrifugado a 10,000 rpm durante 10 min; como resultado de esta centrifugación se recuperó el pellet en 100 µL de medio con sacarosa 250 mM, TRIS 10 mM y 0.5 % de BSA (albúmina sérica de bovino), se incubó por 10 min y se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min, se resuspendieron los pellets en 1 ml del medio antes descrito sin EDTA y 0.2% de BSA. Se cuantificó proteína por el método de (Lowry y cols 1951).

PREPARACION DE FRACCIONES MITOCONDRIALES: Las mitocondrias se pasaron por gradientes discontinuos de percoll, utilizando dos concentraciones: 25% y 40%. El percoll se disolvió en sacarosa 250 mM, TRIS 10mM, pH 7.3. Esta preparación (gradiente de percoll y mitocondrias) se ultracentrifugó a 18 000 RPM durante 15 min. Las fracciones obtenidas se centrifugaron a 10 000 RPM durante 10 min, utilizando sacarosa 250 mM , TRIS 10 mM, pH 7.3, en este buffer se resuspendió el pellet (1ml aproximadamente). Finalmente se cuantificó proteína de cada fracción por el método de (Lowry y cols 1951).

Las fracciones mitocondriales obtenidas del gradiente de percoll, se incubaron con 0.06mg digitonina /mg de proteína durante 15 min a 4°C. Para detener la reacción del detergente se adicionaran tres volúmenes de sacarosa 250 mM, TRIS 10 mM, pH 7.3. Por medio de centrifugación diferencial se obtuvieron por un lado mitoplastos en el pellet y membrana externa en el sobrenadante. Para los ensayos de transporte de calcio en mitoplastos, se lavaron los mitoplastos una vez más con el medio antes descrito, centrifugando este último lavado a 9 000 RPM durante 10 min. Finalmente el pellet se resuspendió en sacarosa 250 mM/ TRIS 10 mM pH 7.3 y se cuantificó proteína por el método de (Lowry y cols 1951) .

CITOCROMO OXIDASA: Citocromo Oxidasa: Esta enzima cataliza la oxidación de cuatro moléculas de Citocromo C y la reducción concomitante de una molécula de oxígeno por cuatro electrones:

$4 \text{Cit } c^{2+}_{(\text{red})} + 4\text{H}^+ + \text{O}_2 \longrightarrow 4\text{Cit } c^{3+}_{(\text{oxl})} + 2\text{H}_2\text{O}$, la actividad sólo se encuentra en mitocondrias (Brautigan, 1978). Se incubó 1 mg de proteína de cada una de las fracciones mitocondriales a 25 °C en 2 ml de medio saturado con oxígeno. Dicho medio está compuesto de 25 mM TRIS/HCL, 7mM ascorbato pH 7.4; una vez que se llevó el oxímetro a 100% con una velocidad de papel de 2 mm/seg, se agregó 5 µM citocromo C, 160 µM de antimicina A, finalmente se agregó 0.5 µM de CCCP. Se hizo un control utilizando cloruro de potasio a una concentración de 1 mM para inhibir a la enzima. Coeficiente Respiratorio: Se midió el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria y se calculó la síntesis de ATP durante la fosforilación oxidativa; se calculó el coeficiente respiratorio, que osciló entre 3 y 10 (48). Para ello se utilizó un medio de KCl 125 mM, HEPES 10mM, succinato 10mM, ácido fosfórico 3mM a pH 7.3.

ACUMULACION DE CALCIO: La acumulación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, se midió por medio de la técnica de filtración, utilizando membranas Millipore de 0.45 micras de tamaño de poro. A 3 mL de sacarosa 250 mM, HEPES 10mM, 200 μM de ADP, succinato 10 mM pH 7.3, fosfato 4m y 3 μg rotenona, se adicionó 1 mg de proteína mitocondrial, y 50 μM de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ con actividad específica de 600 cpm/nmol. Se tomaron alícuotas de 200 μL a tiempo de velocidades iniciales, se filtró al vacío, se lavó con KCl 0.1 M y se contó la radioactividad de las muestras. La actividad de las muestras se midió en un contador de centelleo marca Beckman modelo LS 7800 (Zazueta y cols, 1994)

SÍNTESIS DEL ANÁLOGO DE ROJO DE RUTENIO :

CON FENANTROLINAS:

La síntesis de los compuestos análogos al rojo de rutenio, se basó en la sustitución de los grupos aminos por fenantrolinas, las cuales son ligandos altamente aromáticos, que esperabamos generaran un gran cambio en la forma y en el tamaño del catión del rojo de rutenio, para posteriormente determinar su actividad biológica.

Para llevar a cabo la síntesis se disolvió el rojo de rutenio (0.3 o 0.38 mmol) en 10 ml de agua, bajo corriente de nitrógeno para evitar que el análogo al rojo de rutenio se oxidara a otros compuestos (por ejemplo el café de rutenio).

Se filtró la solución para la eliminación de impurezas solubles en agua bajo corriente de nitrógeno. El filtrado se colocó en un matraz de bola junto con 4.5 g de fenantrolina, previamente disuelta en metanol (60ml). La mezcla se mantuvo en agitación constante por 24 Hrs.

Pasado el tiempo de agitación se hizo un calentamiento suave a 45°C, con flujo constante de nitrógeno por 6 hrs; el compuesto se precipitó con hexafluorofosfato de amonio y se lavó exhaustivamente con etanol, mismo que se evaporó a temperatura ambiente.

RUTENIO 360:

Se disolvieron 2.5 mg de cloruro de rutenio, con 0.015 mL de ácido clorhídrico a una concentración de 6 N junto con 0.002 mL de etanol absoluto. Esta mezcla se calentó por 60 minutos a una temperatura de 90 °C, después se adicionó 0.002 mL de amoníaco concentrado y 0.2 mL de hidróxido de amonio 12 N. Esta mezcla se calentó por 20 minutos a 90 °C, finalmente se incubó 12 horas a 40 °C.

El volumen que se recuperó se pasó por una columna de carboximetilcelulosa que previamente se equilibró con formiato de amonio 0.2 M, pH 5.0. La elusión se hizo con formiato de amonio en gradiente lineal de concentración de 0.2 a 0.6 M. Para finalizar se realizó un espectro donde se seleccionaron aquellos tubos que presentaban un pico de absorbancia a 360 nm. Estos tubos se colectaron en uno solo y finalmente se cuantificó la concentración final de rutenio 360 ($\epsilon = 2.6 \times 10^4$ l/mol.cm). Para el caso del rutenio 360 marcado radioactivamente se siguió la misma estrategia, solo se partió de cloruro de rutenio con marca radioactiva.

Los ensayos de inhibición del transporte se realizaron en un medio de 125 mM de KCl, 10 mM HEPES, 10 mM succinato y 3mM de ácido fosfórico pH 7.3 a 25 °C a diferentes tiempos con diferentes concentraciones de los

Inhibidores. El rojo de rutenio y el rutenio fenantrolina se disolvieron en agua para preparar los Stock.

Resultados y Discusión

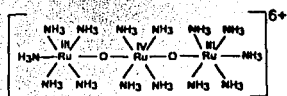
Una vez que se sintetizaron los inhibidores, se realizaron los ensayos de inhibición del transporte de calcio, en fracciones mitocondriales que presentaron más del 95% de la actividad total de citocromo oxidasa.

Los inhibidores que comparamos son compuestos polinucleares de rutenio, que poseen una estructura básica, las modificaciones para obtener compuestos con diferente carga y masa, se hicieron en los sustituyentes de esta estructura central.

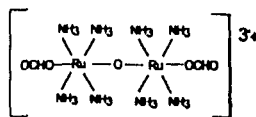
La **Figura 3** muestra la estructura del rojo de rutenio, del rutenio 360, y del análogo del rojo de rutenio con sustituyentes de fenantrolina. Una solución de 16 μM de Ru 360, mostró un pico único de absorbancia máxima a 360 nm, no se detectó absorbancia a 533 nm, lo cual indica que este compuesto carece de contaminación por rojo de rutenio. Por otra parte el espectro realizado al rojo de rutenio, se mantuvo libre de pico de absorbancia a 360 nm. Ambos compuestos se utilizaron para evaluar la inhibición del transporte de calcio en la mitocondria.

El compuesto al que se le adicionaron los grupos fenantrolinas como sustituyentes, se analizó por espectrofotometría de resonancia magnética

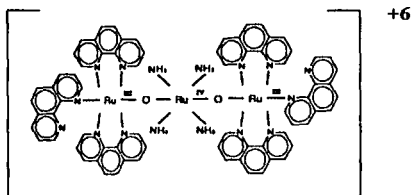
nuclear a 297 K, encontramos el mismo patrón descrito para las fenantrolinas libres en este análogo del rojo de rutenio, sin embargo, sugerimos una disposición coordinada de las fenantrolinas en el compuesto, debido al ligero desplazamiento de los picos. El espectro en visible del Ru Phen mostró un pico principal a 534 nm semejante al que muestra el rojo de rutenio.



ROJO DE RUTENIO



Ru₃300



Ru Phen

Figura 3. Estructuras del rojo de rutenio (de Carrondo et al., 1980) y Ru360 (Ying et al., 1980). Se muestra también un posible arreglo de las fenantrolinas en el compuesto análogo al rojo de rutenio que sintetizamos (Ru Phen).

Se determinó la inhibición del transporte de calcio con cada uno de estos compuestos en mitocondrias energizadas, en las condiciones descritas, en la **Figura 4** se muestra la curva de transporte de calcio a diferentes concentraciones de Ru360. El análisis cinético se hizo por medio del gráfico de Dixon para inhibidores fuertemente unidos.

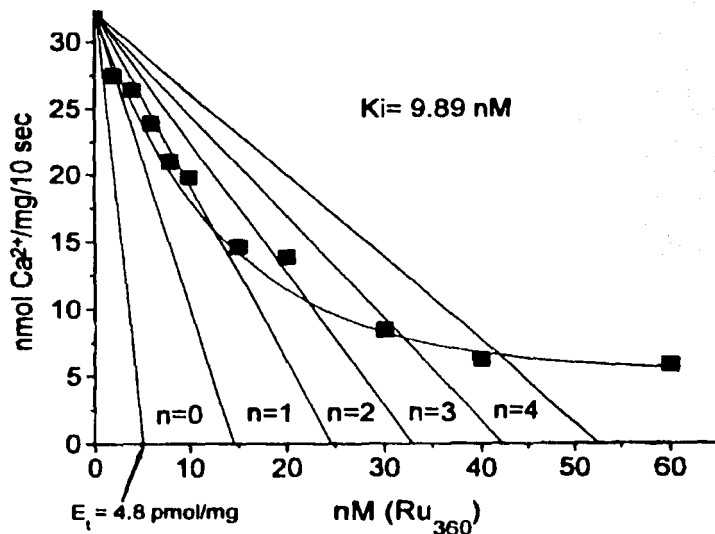


Figura 4. Gráfico de Dixon para inhibidores fuertemente unidos. El transporte de calcio se midió en presencia de diferentes concentraciones de Ru 360, en las condiciones descritas en material y métodos.

El uniportador de calcio mitocondrial presentó una gran afinidad por el inhibidor; la KI obtenida fue de 9.89 nM; de acuerdo a lo anteriormente reportado por Zazueta et al (1998). En base a este análisis se calculó una concentración de inhibidor unido al uniportador de 4.8 pmol /mg de proteína .

Este resultado no concuerda con el trabajo realizado por Matlib et al (1998) en mitocondrias de corazón de rata. Este grupo midió el transporte de calcio espectrofotométricamente con arsenazo III en presencia de Ru 360 y reportaron una IC₅₀ de 0.1854 nM y una unión máxima del inhibidor de 80 fmol / mg de proteína. A pesar de esta diferencia que podría ser tejido específica es claro que la capacidad inhibitoria del Ru 360 frente al rojo de ruteno purificado es muy significativa , lo cual ha llevado a proponer que el Ru 360 es el inhibidor mas potente del transporte de calcio mitocondrial.

La afinidad del Ru360 también se determinó midiendo la unión del inhibidor radioactivo a mitocondrias en un medio de KCl y TRIS. La curva de unión obtenida, fue de carácter hiperbólico y alcanzó la saturación alrededor de 20 nM (**Figura 5**). La pegada específica se determinó por un gráfico de Scatchard, mediante el cual se determinó un Bmax de 6.2 pmol/mg de proteína mitocondrial; la Kd fué de 16.5 nM (figura 5 inserto).

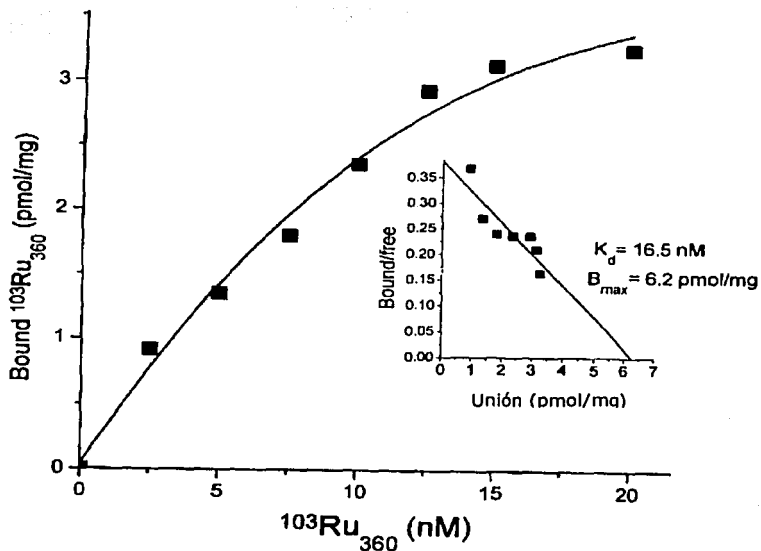
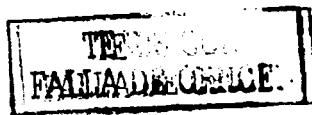


Figura 5. Unión de Ru360 a mitocondrias de riñón de rata, dentro de esta figura se muestra el Scatchard de la unión de dicho inhibidor

La relación entre la pegada del complejo binuclear del rutenio y la inhibición del transporte de calcio mitocondrial tienen una clara correspondencia, lo que indica que existe alrededor de 10 pmol de



uniportador por miligramo de proteína mitocondrial y que el inhibidor es muy específico

La gran variedad de compuestos amoniacales de rutenio que se obtienen a partir de la síntesis del inhibidor rojo de rutenio, ha llevado a otros grupos a preguntarse si todos ellos puede actuar como inhibidores del transporte. En 1974 Reeb y Bygrave llevaron a cabo este análisis y encontraron que los análogos mononucleares obtenidos en la síntesis no inhibían el transporte de calcio mitocondrial, por lo que sugirieron la existencia de un compuesto de bajo peso molecular que absorbe a 355nm, con capacidad de inhibir el transporte de calcio. Aunque están estructuralmente relacionados, la diferencia en el poder inhibitorio es muy marcada entre el rojo de rutenio y el Ru 360; estos compuestos difieren en carga de manera importante (+6 vs +3)

Se hicieron los experimentos de inhibición de transporte en presencia de ambos inhibidores. Los resultados nos muestran que existe competencia entre el rojo de rutenio y el Ru 360 por los sitios del uniportador de calcio mitocondrial.

En la **Figura 6** observamos la inhibición producida por el Ru360 en presencia de concentraciones crecientes de rojo de rutenio. La mutua exclusividad del Ru360 y el rojo de rutenio, se hizo evidente mediante el

gráfico de Dixon, donde se graficó el inverso de la velocidad contra la concentración del complejo binuclear, a una concentración fija de calcio y diferentes concentraciones de rojo de rutenio(Figura 7a).

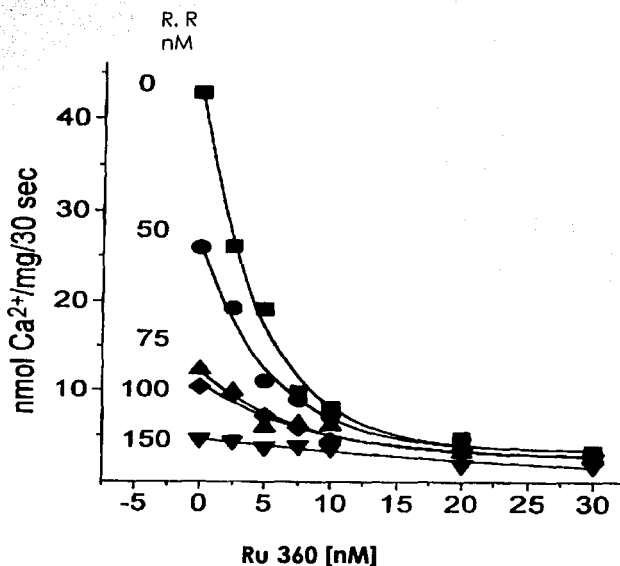


Figura 6. Inhibición producida por el Ru360 en presencia de concentraciones crecientes de rojo de rutenio y a una concentración fija de calcio. Las condiciones se describen en material y métodos.

Las pendientes de las curvas son independientes de la concentración agregada de rojo de rutenio. La familia de curvas son claramente paralelas lo que tipifica un comportamiento de inhibidores mutuamente excluyentes. Su intersección en el eje de las ordenadas, es decir, el inverso de la velocidad representa la inhibición solamente del rojo de rutenio a diferentes concentraciones. El gráfico de estos valores representa el gráfico de Dixon para este inhibidor con una K_i de 25nM (**Figura 7 b**), muy parecidos a lo reportado por Reed y Bygrave (30 nM).

Con esta curva podemos demostrar una inhibición no competitiva para este inhibidor, ya que cuando el complejo enzima-sustrato-inhibidor no es catalíticamente activo la curva es lineal. El mismo fenómeno ocurrió cuando se adicionaron diferentes concentraciones de rojo de rutenio , contra concentraciones fijas de Ru360.

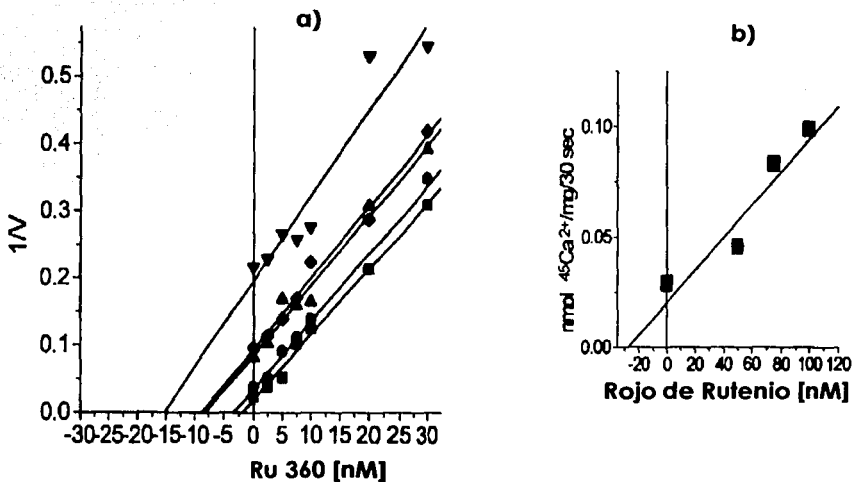


Figura 7. **a)** Gráfico de Dixon para los valores de la figura 7. (■ Sin rojo de rutenio; ● 50 μM de rojo de rutenio; ▲ 75 μM de rojo de rutenio; ◆ 100 μM de rojo de rutenio; ▼ 150 μM de rojo de rutenio). **b)** Re gráfico de Dixon. De los valores de la inhibición a diferentes concentraciones de rojo de rutenio (Ru 360 = 0). Las determinaciones de transporte se hicieron como se describe en material y métodos

Se analizó también la inhibición producida por un derivado del rojo de rutenio, rutenio fenantrolina (Ru Phen), en el transporte de calcio mitocondrial en presencia de diferentes concentraciones fijas de rojo de rutenio en el medio de transporte. En la **Figura 8** se observa que la

inhibición aumenta conforme incrementamos la concentración del rojo de rutenio. Lo que se pretendió con este experimento, fue determinar si hay competencia por los sitios de unión al uniprotector entre el rojo de rutenio y su derivado (Ru phen).

Para determinar el tipo de inhibición del Ru Phen en presencia de rojo de rutenio se graficó el inverso de la velocidad contra la concentración de Ru Phen (gráfico de Dixon) a diferentes concentraciones de rojo de rutenio (Figura 9)

La familia de curvas que se genera, muestra un comportamiento de inhibición cooperativa por dos diferentes inhibidores no exclusivos. Se calculó una K_i para el Ru Phen de $1.25 \mu\text{M}$. (Figura 9). Este tipo de gráfico podrá decirnos que el rojo de rutenio y el Ru Phen no se están uniendo al mismo sitio, o que la concentración de rojo de rutenio no es suficiente para desplazar al Ru Phen, ya que estructuralmente son compuestos muy parecidos. Sin embargo es importante mencionar que en este caso el rutenio fenantrolina es más voluminoso que el Ru 360 y que el rojo de rutenio, además de que debe poseer un carácter más hidrofóbico debido a los sustituyentes de fenantrolina.

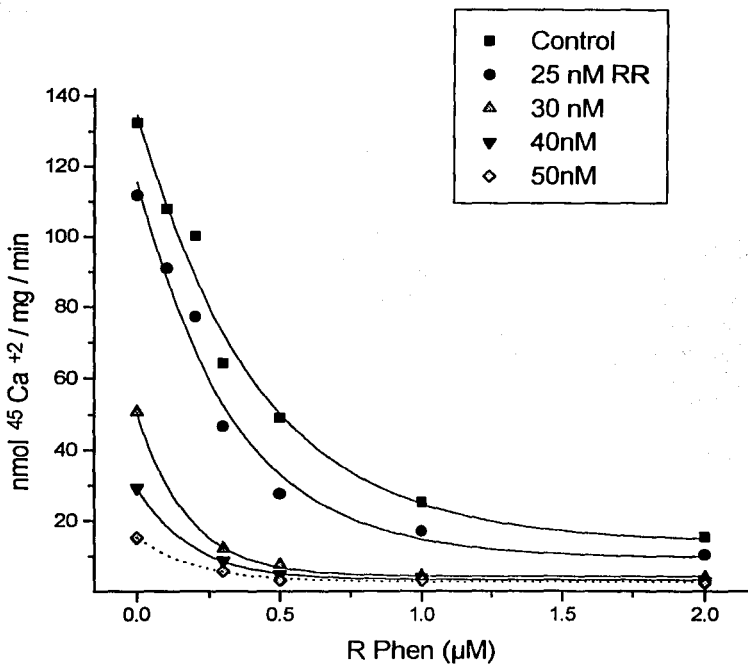


Figura 8. Inhibición del transporte de calcio mitocondrial producida por rutenio fenantrolina en presencia de rojo de rutenio. Las condiciones experimentales se describen en material y métodos

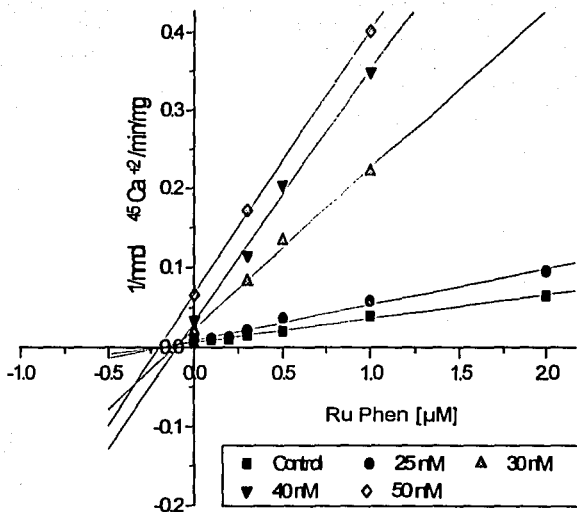


Figura 9. Gráfico de Dixon para inhibidores cooperativos no exclusivos. Las determinaciones se hicieron bajo las condiciones antes descritas.

Se ha reportado que el rojo de rutenio también se une a los llamados sitios de pegada de calcio de baja afinidad, al igual que los lantánidos (un inhibidor competitivo del uniportador de calcio mitocondrial).

Se ha propuesto que estos sitios pueden ser fosfolípidos (Voelker, 1996), también se ha demostrado que el rojo de rutenio se comporta en una bicapa difusa como si fuera un ión con una carga neta de +6 y que este presenta una alta afinidad por la fosfatidilserina.

Para tratar de profundizar sobre esta cuestión se hicieron ensayos de competencia modificados*, para determinar si el Ru360 se comporta igual que el rojo de rutenio en presencia de lantánidos. Observamos que la adición de Ru360 en presencia de diferentes concentraciones de lantano producen un aumento en la inhibición (Figura 10).

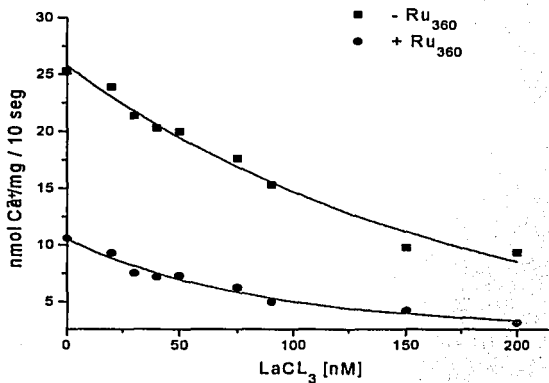


Figura 10. Ensayo de competencia entre el Ru360 y lantano. El medio de transporte de calcio no contenía fosfato* y la concentración de Ru 360 fue de 40 nM.

El análisis de Dixon (**Figura 11**) muestra que los sitios de alta afinidad de los lantánidos por el uniportador, ($K_i = 100\text{nM}$) no se modificó en presencia de Ru 360. Solo fueron modificados los sitios de baja afinidad. Esto nos sugiere que probablemente el Ru360 esté desplazando a los lantánidos de los sitios de unión en los fosfolípidos no específicos, pero no de los sitios que unen calcio en el uniportador.

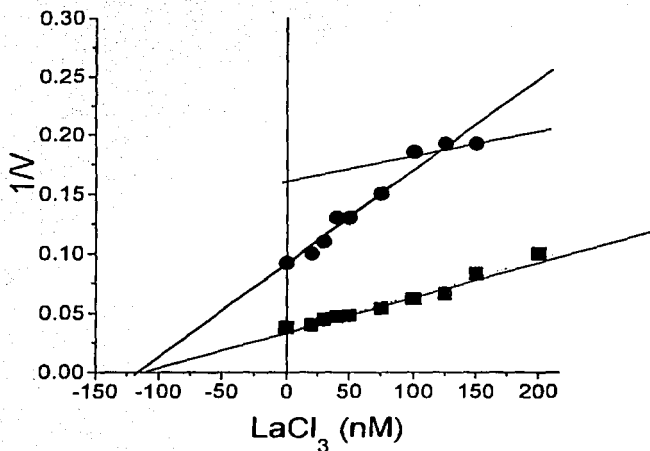


Figura 11. Gráfico de Dixon, para la inhibición del transporte de calcio mitocondrial en presencia de Ru360 ● (40nM) ■ y en ausencia de Ru360. Las condiciones experimentales se describen en material y métodos.

Entre otros inhibidores de entrada de calcio ajenos a los obtenidos a partir de la síntesis de rojo de rutenio, está el clorhidrato de cobalto hexamina, un complejo mononuclear de amonio $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]$. Se ha sugerido que este compuesto reacciona con las cargas negativas de los sulfatos presentes en los glicosaminoglicanos, y además se ha usado para la determinación de la concentración total de grupos aniónicos en las proteínas. Los datos cinéticos obtenidos a partir de la utilización de este compuesto en la inhibición del transporte de calcio mitocondrial, son de un orden de magnitud mayor a los reportados para los análogos del rojo de rutenio. Tashmukhamedov (1972).

Se ha establecido que el rojo de rutenio en medio acuoso se comporta como un catión hexavalente, y es precisamente este carácter lo que promueve la interacción de este polcatión con las membranas biológicas (Carrondo 1980)

En 1990, Missiaen propuso que la inhibición producida por el rojo de rutenio en los movimientos de calcio tenía un origen electrostático mediado en gran parte por la neutralización de cargas negativas por los fosfolípidos.

Para definir si la unión de estos Inhibidores es puramente electrostática se utilizó al inhibidor Ru Phen. El esqueleto base del compuesto Ru Phen está formado por tres rutenios coordinados: Ru-O-Ru-O-Ru (al igual que el rojo de rutenio) , mas sin embargo, los grupos aminos fueron substituidos por grupos fenantrolina.

Así , el compuesto conserva una carga positiva de +6. La constante de Inhibición que se obtuvo para este compuesto fue de 1.5 μM , lo cual representa en términos de constantes de Inhibición, una magnitud mayor que para el rojo de rutenio y aun más comparada con el Ru 360. Al tener en su estructura fenantrolinas en lugar de grupos aminos, el compuesto es mucho mas grande que el rojo de rutenio y el Ru 360. Por tanto es lógico pensar que el Impedimento estérico para acomodarse o acoplarse a su sitio en el uniportador de calcio será mayor.

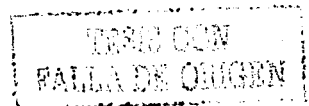
El Ru 360, a diferencia del rojo de rutenio y del Ru Phen, es un compuesto binuclear con una carga en cada rutenio, lo que lo hace, por un lado mas pequeño y por otro lado le da la propiedad de tener una carga deslocalizada (Matlib et al 1998)

Los datos obtenidos en este trabajo nos han llevado a proponer un modelo de acción para los inhibidores polcatiónicos del uniportador de calcio, considerando también los datos reportados por otros grupos.

El uniportador ha sido considerado como un poro con compuertas, con un par de sitios de reconocimiento para calcio (Sparaganna 1995 y Lifsky 1997), muy cerca al citoplasma, como se presenta en la **Figura 12**.

Tanto el rojo de rutenio como sus derivados son inhibidores no competitivos, es decir no compiten por los sitios de unión a calcio del uniportador sino que se unen a otros sitios con alta afinidad y probablemente también a sitios de baja afinidad proporcionados por los fosfolípidos ácidos cercanos al uniportador de calcio mitocondrial (Reed 1974).

La alta especificidad del rojo de rutenio y Ru 360 hacia el uniportador nos sugiere que del lado citoplasmático de este transportador existe una densa región de cargas negativas, donde presumiblemente se pueden unir los inhibidores, provocando así un cambio conformacional en el uniportador de calcio.



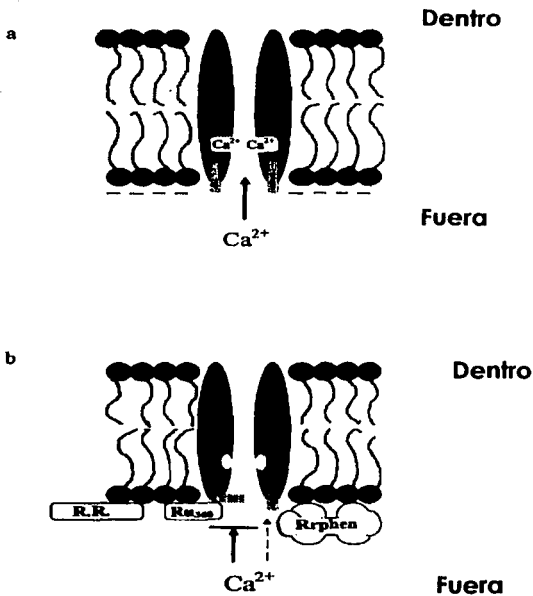


Figura 12. probable mecanismo de acción de los inhibidores policatiónicos del uniportador de calcio mitocondrial . a) Sitios de alta afinidad a calcio. b) Sitios probables de unión de inhibidores, así como el cambio conformacional que sufren cuando se unen estos compuestos

Al rojo de rutenio lo podemos visualizar como un cilindro de 1.2 nm de longitud o como una formación lineal de tres cargas positivas, cada una de ellas separadas por una distancia de 0.6 nm (Carrondo 1980). La estructura del Ru 360 se ha establecido como un cilindro de 0.8 nm (Ying 1990).

En la figura 12 b se muestran los complejos amoniacales de rutenio descrito en este trabajo y su posible interacción con el uniportador de calcio. Se considera también la influencia que pudieran ejercer sobre los fosfolípidos de la membrana cercanos al uniportador. Al unirse estos compuestos podrían promover un cambio conformacional en el uniportador inhibiendo el transporte. La baja afinidad por el Ru Phen, se puede explicar por su carácter hidrofóbico, que hace que reaccionen inespecíficamente con los lípidos de la membrana, el tamaño de este compuesto, puede además provocar un impedimento estérico, que impide la interacción del compuesto con el uniportador y de ahí que no modifique precisamente los sitios de unión al calcio que actúan en el transporte.

Conclusiones:

El inhibidor específico y más potente para el transporte de calcio es el Rutenio 360. Este ejerce una inhibición de tipo no competitiva.

El rutenio 360 con respecto al rojo de rutenio, resulto ser un inhibidor mutuamente excluyente.

El derivado de rutenio O-fenantrolina es el compuesto menos efectivo para la inhibición del transporte de calcio mitocondrial, este presento una inhibición cooperativa en presencia de rojo de rutenio.

La unión de lantano no fue desplazada por la presencia de Ru 360 en el medio, se observa una potenciación de la inhibición producida por ambos compuestos.

Las características de los inhibidores y la densa región de cargas negativas presentes en el lado citoplasmático del uniportador, sugieren que estos compuestos se unen a esta región provocando así un cambio conformacional en el uniportador de calcio.

BIBLIOGRAFÍA

- Åkerman K. E. O. (1977) " Effects of cation on the temperature sensitivity of Ca^{2+} transport in rat-liver mitochondria" J. Bioenerg. Biomembr. 9, 141-149.
- Åkerman K.E. O. (1977b) " Effects of Mg and spermine on the kinetics of Ca^{2+} uptake in rat liver mitochondria" J. Bioenerg. Biomembr. 9, 65 - 72.
- Allshire A., Bernard P. y Saris N. E. L (1985) "Manganese stimulates Ca^{2+} flux through the mitochondrial uniporter" Biochem. Biophys. Acta 807, 202 - 209.
- Blackshear P.J, Nairn A. C. y kuo J.F. (1988) " Protein kinases 1988: A current perspective" FASEB J. 2, 2957- 2696.
- Bragadin M., Pazzan T. y Azoné G.F. (1979) " Kinetics of Ca^{2+} carrier in rat liver mitochondria" Biochem 18, 5972-5978.
- Brand M.D. y Muiyphy M.P. (1987) " Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cell" Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 62, 141-193.
- Brautigan, D. C.(1978). Methods In Enzimology. 53. 128-164.
- Brierley G.P., Davis M. Y Jung D.W. (1987) " Respiratory-dependent uptake and extrusion of Mg^{+2} by isolated heart mitochondria" Arch. Biochem. Biophys. 253, 322-332.

- Brierly G.P., Murer E. y Bachman E. (1964) " The accumulation of Ca^{2+} and Pi by heart mitochondria" Arch. Biochem. Biophys. 105, 89.
- Bygrave F.L., Reed K. C. y Spencer T. (1971) " Cooperative interaction in energy-dependent accumulation of Ca^{2+} by isolated rat liver mitochondria" Nature new Biol. 230, 89-91.
- Bygrave F. L. (1977) " Mitochondria calcium transport" Curr. Top. Bioenerg. 6, 259-318.
- Bygrave F. L. y Ash G.R. (1977) " Development of mitochondrial calcium transport activity in rat liver" FEBS Lett. 80, 271-274.
- Carondo M., Griffith W., Hall J. and Skalski A. (1980) "X-ray structure of $[Ru^{3+}O_2(NH_3)_4]^{6+}$ cation of the cytological reagent Ruthenium Red". biochem. Biophys. Acta. 627, 332-334.
- Cooper R. H. Randle P.J. y Denton R.M. (1974) " Regulation of heart muscle pyruvate dehydrogenase kinase " Biochem. J. 143, 625
- Crompton M., Sijgel E., Salzmann M. y Carafoli E. (1976) " A kinetic study of the energy-linked influx of Ca^{2+} into heart mitochondria" Eur. J. Biochem. 69, 429-434.
- Chance B. (1965) " The energy-linked reaction of calcium with mitochondria" J.Biol. Chem. 240 , 2729-2748.

- Chapell J. B., Cohn M. y Greville G. D. (1963) en "Energy linked function of mitochondria" editada por B. Chance. New York, Academic Press pp. 219-231.
- Chávez E., Briones R., Michelle B., Bravo C. Y Jay D. (1985) "Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium uniporter: Studies with cadmium" Arch. Biochem. Biophys. 242, 493-497.
- Davidoff F. (1974) " Effects of the guanidine derivatives on mitochondrial function : Ca^{2+} uptake and release" J. Biol. Chem. 249, 6404-6415.
- Denton R.M y McCormack J. G. (1980) "On the role of calcium transport system in Heart and other mammalian mitochondria" FEBS Lett. 119, 1-18.
- Denton R.M y McCormack J. G. (1985) " Calcium transport in mammalian mitochondria and its role in hormone action" Am. J. Physiol. 249, E543- E554.
- Diwan J.J. (1987) " Mitochondrial transport of K^+ and Mg^{+2} " Biochem. Biophys. Acta 895, 155-165.
- Doussiere J., Ligeti E. , Brandolin B. y Vignals P.V. (1984) "Control of oxidative phosphorylation in rat heart mitochondria. The role of the adenine nucleotide carrier". Biochem. Biophys. Acta 766, 492-500.
- Drahota Z., Gazzotti P., Carafoll E. y Rossi C. S. (1969) " A comparison of the effect of different divalent on a number of mitochondrial reaction linked to ion translocation" Arch. Biochem. Biophys. 130, 267-273.

Ezawa I. y Ortega E. (1979) "Ca²⁺ -induced activation of succinate dehydrogenase and the regulation of mitochondrial oxidative reations" J. Biochem, 85, 65.

Farber J. L. (1981) " The role of calcium in cell death" J. Biochem. 85, 65.

Farber J.L. (1982) " Membrane Injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of cogitative necrosis" Lab. Invest: 47, 114-123.

Farber J.L. (1990) "The role of calcium in lethal cell injury". Chem res. Toxicol. 3, 503-508.

Fletcher J. M., Greenfiel B.F., Hardy C.J., Scargill D. Woodhead J. L. (1961) 2000-2006.

Foldes M. y Barrit G.J. (1977) " Regulation by Ca²⁺ ions of pyruvate carboxilation , pyruvate transport and adenine nucleotide transport in RLM" J. Biol. Chem. 252, 5372.

Gemba M. (1974) "Effect of diuretics on ion transport of kidney cortex mitochondria" Jpn. J. Phamacol. 24, 271-277.

Gleu y Breuel. Z. Anorg. Chem. (1938) 237-350

Gunter T. E. & Pfeiffer D.R. (1990) " Mechanisms by Which Mitochondria Transport Calcium" Am J. Physiol 258, C755-C786.

- Hansford R.G. (1985) "Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism" *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 120, 1-7.
- Heatons G.M. y Nicholls D.G. (1976) "The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of calcium electrochemical gradient" *Biochem J.* 156, 635-646.
- Hoek J. B. (1992) "Hormonal regulation of cellular energy metabolism" en *Molecular mechanism in Bioenergetics*. L. Ernster, Ed. Elsevier, Cap.
- Huston S. M. (1977) "Steady state of the energy-dependent Ca^{2+} Uptake in rat liver mitochondria" *J. Biol. Biochem.* 252, 4539-4545.
- Huston S. M., Pfefler D.R. y Lady H. A. (1976) "Effect of cations and anions on the steady state kinetics of energy-dependent Ca^{2+} transport in rat liver mitochondria" *J. Biol. Biochem* 251, 5251-5258.
- Joly A. (1892) "Composés Ammoniacaux Dérivés du Sesquichlorure de Ruthénum". *C. R. Acad. Sci.* 115, 1299-1301
- Kapoor S. C. van Rossum G.D. V., O'Neil K.J. y Mercorella I. (1985) "Uptake of inorganic lead *In Vitro* by Isolated mitochondria and tissue slices of rat renal cortex" *Biochem Pharmacol.* 34, 1439-1448.
- Kotlyar A. B., Sled U. D. y Vinogradou A. D. (1992) "Effect of Ca^{2+} ions on the slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase" *Biochem. Biophys. Acta* 1098, 144-150.

Kröner H. (1986) "Ca ions, an allosteric activator of Ca^{2+} uptake in rat liver mitochondria" Arch. Biochem. Biophys. 251, 525-535.

Kun E. (1976) "Kinetics of ATP-dependent Mg flux in mitochondria" Biochem. 15, 2328-2336.

Lehninger A. L., Carafoli E. y Rossi C. S. (1967) "Energy-linked ion movements in mitochondria systems" Adv. Enzimol 29, 259 - 320.

Lenzen S., Muster W. y Rustenbeck I. (1992) "Dual effect of spermine on mitochondrial Ca^{2+} transport" Biochem J. 286, 597-602.

Lowry, O. Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. J. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 194: 265-275

Litsky M. y Pfeiffer D (1997) "Regulation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by external adenine nucleotides: the uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations". Biochemistry. Jun 10;36(23):7071-80.

Luff H. J. (1971) "Ruthenium red and Violet. Chemistry, purification methods of use for electron microscopy and mechanism of action" Anat. Rev. 171, 347-368.

Marban E, Rink T.J. (1980) "Free calcium in heart muscle at rest and during contraction measured with Ca^{2+} -sensitive microelectrodes" Nature 286, 845-850

Matlib M., Zhou Z., Knight S., Altschuld R., Ahmed S., Choi K., Krause-Bauer J., Phillips R., Katsube Y., Sperelakis N., y Bers D. (1990) "Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca^{2+} uptake into mitochondria in vitro and in situ in single cardiac myocytes". J Biol Chem. Apr 24;273(17):10223-31.

McCormack J.G., Helestrap A.P., Denton R.M. (1990) "Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism". Physiol. Rev. 70, 391-425.

McMillan-Wood J., Walkowicz P.E., Chu A., Tate C. A. Goldstone M.A. y Entman M.L. (1980) "Calcium uptake by two preparation of mitochondria from heart" Biochem. Biophys. Acta. 591; 251-265.

Meijer A.J., Van Woerkom G. M., Steinman R. y Williamson J.R. (1981) "Inhibition by Ca of Carbamylphosphato synthetase" J. Biol. Chem. 256, 3443.

Moreno-Sánchez y Hansford R.G (1988) "Dependence of cardiac mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity on intramitochondrial free Ca^{2+} concentration". Blochem J. 1988 Dec 1;256(2):403-12.

Moreno-Sánchez y Hansford R.G (1988) Relation between cytosolic free calcium and respiratory rates in cardiac myocytes. Am J Physiol. 1988 Aug;255(2 Pt 2):H347-57.

Murphy A.N., Kelleher J.K. y Fiskum G. (1990) "Submicromolar Ca^{2+} regulates phosphorylating respiration by normal rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria by different mechanisms" J. Biol. Chem. 265, 10527-10534.

Nicotera P., Bellomo G. y orrenius S. (1990) "The role of Ca^{2+} in cell killing" Chem. Res. Toxicol. 3, 484-494.

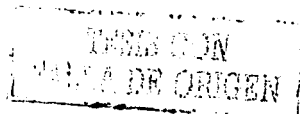
Nicholls D.G y Scott I. D. (1980) "The regulation of brain mitochondrial calcium-ion transport. The role of ATP in the discrimination between kinetic and membrane-potential-dependent calcium-ion efflux mechanisms". Biochem J. Mar 15;186(3):833-9.

Nicholls D.G y Crompton M. (1980) "Mitochondrial calcium transport" FEBS Lett. 111, 261-268.

Noack E. y Greeff K. (1971) "Inhibition of calcium transport in mitochondria by β -receptor blocking substances and its reactivation by phospholipids" Experientia Basel 27, 810-811.

Puskin J. S., Gunter T.E., Gunter K. K., Russell P.R. (1976) "Evidence for more than one Ca^{2+} transport mechanism in mitochondria" Biochem. 15, 3834-3842.

Puskin J.S., Gunter T.E. (1976) "Ion and pH gradients across the transport membrane of mitochondrial following Mn^{+2} uptake in the presence of acetate" Biochem 15, 3834- 3842.



- Reed K. C. y Bygrave F.L (1974) " The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red" Blochem J. 138, 239-252.
- Reed K. C. y Bygrave F.L (1974) "A kinetic study of mitochondrial calcium transport" FEBS Letter 46, 109-114
- Reed D.J. (1990) " Review of the current status of calcium and thols in cellular injury" Chem. Res. Toxicol. 3, 495-502.
- Reed K.C. y Bygrave F.L (1975) "The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red". Eur. J. Chem. 55, 497-504.
- Riley W. W. Jr. y Pfeifer D.R. (1986) " Rapid and extensive release of Ca^{+2} from energy mitochondria induced by EGTA" J. Biol. Chem. 261, 28-31.
- Rossi C. S., Vasington F.D. y carafoll E. (1973) The effect of ruthenium red on the uptake Ca^{+2} and release of Ca^{+2} by mitochondria Blochem. Biophys. Res. Commun. 50, 846-852.
- Rottenberg H. y Scarpa A. (1974) " Calcium uptake and membrane potential in mitochondria" Blochem. 13, 4811-4866.
- Rugolo M. y Zoccarato F. (1984) " Mg^{+2} transport by brain mitochondria: energy requirement and dependence on calcium efflux" J. Neurochem. 42, 1127-1130.
- Scarpa A y Azzone G.F. (1970) " The mechanism of ion translocation in mitochondria. 4 coupling of K efflux with Ca uptake" Eur. J. Biochem 12, 328-335.

Scarpa A. y Graziottini P. (1973) "Mechanism for intracellular Ca^{+2} regulation in heart" J. Gen Physiol. 62, 756-772.

Schnaitman C., Gene, E.V. (1967) J. Cell Biol. 32, 719-735.

Staler E.C. y Cleland K.W. (1953) "The effect of Ca^{+2} on the respiratory and phosphorylative activities of heart-muscle sarcosomes" Biochem J. 55, 566.

Sparanga G., Gunter K., Shen S., y Gunter T. (1995) "Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. J Biol Chem. 1995 Nov 17;270(46):27510-5.

Tashmukhamedov B.A., Gagelgans A. I., Mamatkulov K. y Makhmudova E.M. (1972) FEBS Lett. 28, 239-242.

Vainio H., Mela L. y Chance B. (1970) "Energy-dependent bivalent cation translocation in rat liver mitochondria" Eur. J. Biochem. 12, 387-391.

Vasington F.D. y Murphy J.V. (1962) "Ca²⁺ uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation" J. Biol. Chem. 237, 2670 - 2677.

Vercesi A., Reynafarge B. y Lehninger A. L. (1978) "Stoichiometry of H⁺ ejection and Ca²⁺ uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria" J. Biol. Biochem. 253, 6379-6385.



Voelker D. y Smejtek P. (1996) "Adsorption of ruthenium red to phospholipid membranes". *Biophys J.* 1996 Feb;70(2):818-30.

Vonogradov A. y Scarpa A. (1973) "The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria" *J. Bioenerg. Biomembr.* 49, 607-607.

Wernette M.E., Ochs R.S. y Lardy H.A. (1981) "Ca²⁺ stimulation of RLM glycerophosphate dehydrogenase" *J. Biol. Chem.* 256, 12767.

Ying W., Emerson J., Clarke M. y Sanadi R. (1990) "Inhibition of mitochondrial calcium ion transport by an oxo-bridged dinuclear ruthenium ammine complex" *Biochemistry.* 1991 May 21;30(20):4949-52.

Zazueta, C. Reyes-Vivas H, Corona N, Bravo, C. Chávez, E. (1994). "On the role of ADP to increase the inhibitory effect of cyclosporin on mitochondrial membrane permeability transition". *Biochem. Mol. Biol. Int.* Vol. 33, No 2, 385-392.

Zazueta C., Safra G., Vera G., Sánchez C. y Chávez E. (1998) "Advances in the purification of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter using the labeled inhibitor 103 Ru 360" *J. Bioenerg. Biomembr.* Oct; 30(5):489-98.