

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

" Efecto del sodio sobre el Transporte de Calcio  
Soportado por Hidrolisis de ATP en Mitocondrias  
de Corazon de Rata ".

por:

RAFAEL MORENO SANCHEZ.

Tesis Elaborada para obtener el grado de:

BIOLOGO

Los Reyes, Iztacala, Estado de México,

1981.

•



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.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Armando Gomez Puyou, a quien agradezco su continuo interés y sus consejos, además de las enormes facilidades de todo tipo que me brindo para el desarrollo de los experimentos.

La investigación se realizó en el Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

## INDICE .

	Pag.
Introducción.	1
(a) Acumulación masiva de calcio	2
(b) Acumulación limitada de calcio	4
(c) Superestequiometría	8
(d) El Transporte de calcio es por medio de un acarreador.....	12
(e) .....Y es un Proceso Electrogénico dependiente de Energía	16
(f) Transporte de calcio en Mitocondrias de Corazon	18
(g) Transporte de Calcio y Actividad de ATPasa.	25
Material y Metodos.	28
(a) Obtención de Mitocondrias de Corazon de rata	28
(b) Medición del transporte de Calcio	28
(c) Determinación de la actividad de ATPasa	29
(d) Medición del Control Respiratorio	30
Resultados.	31
(a) Eflujo de calcio inducido por sodio	31
(b) Actividad de ATPasa durante el eflujo de calcio	43
Discusión.	50
Bibliografía	55
Glosario	60

## TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE CALCIO

Aunque el estudio sistemático del transporte mitocondrial de calcio y su estequiometría no empezó sino hasta 1961, ya se habían hecho varias importantes observaciones. Potter (1) y Lehninger (2) señalaron por primera vez que el calcio (5 mM) ejercía un potente efecto descoplante sobre la fosforilación oxidativa (FO) sin afectar, en forma significativa, la oxidación de sustrato, tanto en homogenados como en mitocondrias de hígado de rata\*. Utilizando preparaciones crudas de mitocondrias de corazón de rata, Slater y Cleland (3) observaron que, en ausencia de fosfato inorgánico, las mitocondrias podían incorporar grandes cantidades de calcio del medio de incubación (hasta 510 nmol/mg prot. mit.). Por otro lado, Potter et al (4) reportaron que el calcio estimulaba el consumo de oxígeno a un nivel mayor que el obtenido comunmente por la adición de ADP y fosfato inorgánico. La duración de esta estimulación respiratoria (transición del estado 4 al estado 3) era proporcional a la cantidad de calcio añadido y se producían, además, cambios cíclicos de oxidación-reducción de los piridin nucleótidos y de otros componentes respiratorios de una manera semejante a la que causaba la adición de ADP y Pi (5). Por lo tanto, los efectos del calcio sobre la mitocondria (inhibición

\* Cuando se hable de "mitocondria" me referiré a mitocondrias de hígado de rata; en caso contrario, se hará la indicación pertinente.

de la FO y estimulación del consumo de  $O_2$ ), probablemente a través de su transporte hacia el interior del organelo, parecían estar íntimamente relacionados a la actividad de la cadena respiratoria.

#### Acumulación Masiva de Calcio.

Los trabajos de Vasington y Murphy (6a, 6b) y DeLuca y Engstrom (7) vinieron a confirmar que la entrada de calcio a la mitocondria requería del transporte de electrones. Además, estos y otros investigadores establecieron las características principales de la llamada acumulación masiva de calcio (ver tabla I); (1). Las condiciones óptimas de acumulación (sustrato oxidable 6.7 mM, ATP 4 mM,  $Mg^{++}$  10 mM y Pi 4 mM); (2). Las cantidades de calcio que se llegaban a acumular bajo estas condiciones eran de aproximadamente 2,300 nmol/mg; (3). Especificidad para los nucleótidos de adenina (ATP y, en menor grado, ADP podían mantener la acumulación masiva); (4). Inhibición por desacoplantes (DNP, dicumarol, gramidicina y FCCF); (5). El calcio desacoplaba FO e inhibía la respiración en un 50-60%, acorde con las primeras observaciones de Slater y Cleland (3), en una concentración de 2-5 mM y (6) el calcio acumulado estimulaba la síntesis de ácidos grasos endogenos (los cuales son fuertes desacoplantes de la FO) (6b, 8).

Los primeros cálculos estequiométricos entre la acumulación de calcio y el transporte de electrones (9) revelaron que la entrada de calcio se acompañaba de una acumulación con-

junta de Pi en una proporción  $\text{Ca}^{++}/\text{Pi}$  de 1.67 (ver tabla II). Considerando que la proporción de calcio y fosfato también es de 1.67 en la hidroxiapatita  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$ , se sugirió que el calcio se acumulaba en el interior de la mitocondria con fosfato precipitándose como hidroxiapatita.

Otros valores reportados sobre la acumulación masiva de calcio fueron  $\text{Ca}^{++}/0$  4.45 y  $\text{Ca}^{++}/\text{sitio}$  de conservación de energía 1.48 (ver table 2 ). Se descubrió también que la actividad de ATPasa se veía estimulada aproximadamente 20 veces, cuando se incubaban mitocondrias con  $\text{CaCl}_2$  4mM. El transporte de calcio en ausencia de sustrato oxidable podía ser sostenido también por hidrólisis de ATP (9).

En mitocondrias de corazón de bovino se confirmaron esencialmente todas las observaciones sobre la acumulación masiva de calcio (10), pero se demostró que el ATP era necesario no para la acumulación *per se*, sino para mantener al calcio en el interior por largo tiempo. La acumulación de  $\text{Ca}^{++}$  y Pi iba acompañada de una liberación simultánea de  $\text{H}^+$ , cuando era sostenida por ATP o por sustrato. Se calculó, además, la relación  $\text{H}^+/\text{Ca}^{++}$  con un valor de 0.55, con succinato como fuente de energía y de 0.30 con ATP.

Utilizando técnicas de centrifugación en gradiente de sacarosa y  $\text{CsCl}_2$ , microscopía electrónica y difracción de rayos X (11, 12), se demostró que la acumulación masiva de calcio *in vitro* era un evento progresivo y no un fenómeno de "todo a

nada". Igualmente se concluyó que la acumulación masiva estaba estrechamente asociada con la formación de gránulos electrodensos en el interior de la mitocondria (ver fotografía) y que el ATP era un factor indispensable en la estabilidad y conservación de estos gránulos. Este efecto del ATP ya había sido observado por Slater y Cleland (3), en donde los efectos destructivos de la entrada masiva de  $\text{Ca}^{++}$  eran contrarrestados por la adición de ATP. Se realizaron observaciones similares en mitocondria de corazón de bovino y en mitocondrias aisladas de corazones de varios mamíferos que habían sido perfundidos con altas concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (13, 14).

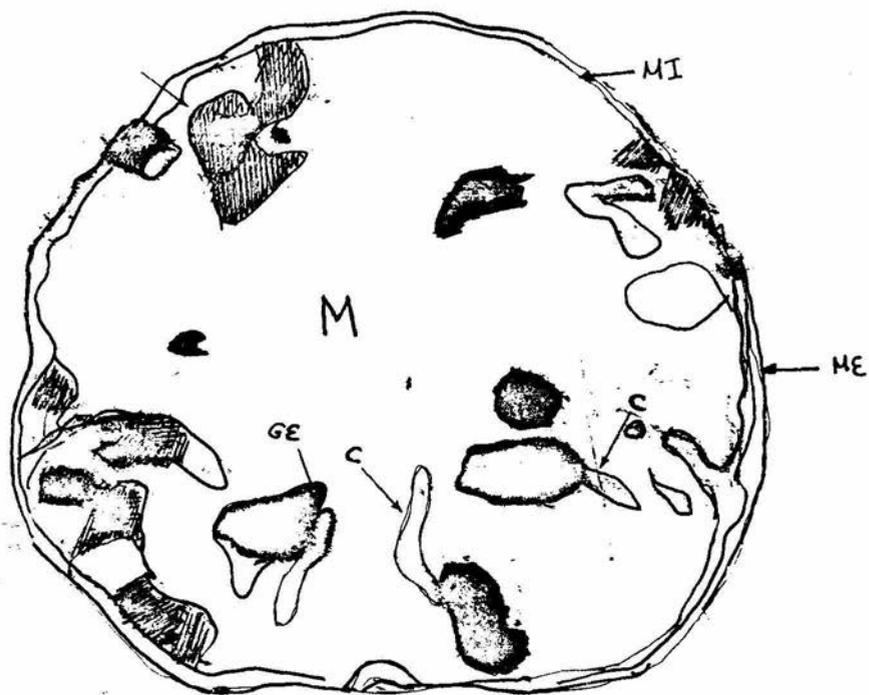
#### Acumulación Limitada de Calcio.

En los trabajos de Vasington y Murphy (6b), Rossi y Lehninger (9) y Brierley et al (10), se utilizaron mitocondrias de riñón, corazón y cerebro, incubadas con altas concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (2-5 mM). Ya que las concentraciones intramitocondriales comunmente encontradas iban de 15 nmol/mg (3) hasta 60 nmol/mg (6b), había la incógnita de si la mitocondria también era capaz de captar calcio, cuando éste se encontraba a concentraciones más bajas en el medio de incubación. Entre los primeros investigadores que abordaron el problema estuvieron los grupos de Brierley, Lehninger y Chance (ver Tabla I).

Al incubar con bajas concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  externo (0.1-0.3  $\mu\text{M}$ ) se observó que la acumulación de  $\text{Ca}^{++}$  también estimulaba la respiración y este efecto no requería de  $\text{Mg}^{++}$  o  $\text{P}_i$ ,

TABLA I. ACUMULACION DE CALCIO EN MITOCONDRIA.

Acumulación masiva	Autor(es)	Acumulación Limitada	Autor(es)
1.- Las condiciones óptimas son: Pi 4mM, ATP 3mM, Mg <sup>++</sup> 10mM y sustrato 6-7mM.	6, 10	1.- Norequiere de Pi o ATP; solo de Mg <sup>++</sup> 10mM.	10
2.- La acumulación máxima es de aprox. 2,300 nmol/mg prot. mit.	"	2.- La acumulación máxima es de aprox 100nmol/mg prot. mit.	"
3.- Es inhibida por DNP, FCCP, di- cumarol y gramicidina	"	3.- Es inhibida por desacoplantes e inhibidores respiratorios.	"
4.- Desacopla totalmente FO e inhi- be en 50-60% la respiración.	"	4.- No estimula la actividad de ATPasa sino más bien la inhibe.	"
5.- Estimula actividad de ATPasa.	"	5.- La acumulación puede ser soste- nida por oxidación de sustrato o hidrolisis de ATP.	10
6.- La acumulación puede ser sos- tenida por oxidación de sustrato o por hidrolisis de ATP.	6, 10	6.- Si se añaden calcio y ADP si- multaneamente, el Ca <sup>++</sup> es acumula- do antes de que ocurra la FO.	13, 14
7.- La entrada de Ca <sup>++</sup> va acompaña- da de una expulsión estequiométrica de H <sup>+</sup> .	6, 10	7.- Desacopla la FO pero no inhibe el transporte de electrones.	13, 14
8.- Estimula la formación de ácidos grasos endógenos.	8	8.- No forma granulos electrodensos	11
9.- La entrada conjunta de Ca <sup>++</sup> y Pi causa la formación de granulos e- lectrodensos en la matriz mitocon- drial de aprox. 1,000 Å de diametro.	11	9.- El Ca <sup>++</sup> no es acompañado por Pi en ausencia de ATP. En su presencia el Pi es acumulado en cantidades estequiométricas.	13
10.- Los granulos probablemente son de hidroxapatita.	9, 11	10.- La entrada de Ca <sup>++</sup> causa un au- mento de la cantidad de H <sup>+</sup> en el medio de incubación	14



Mitocondria con granulos electrodensos formados por la acumulación conjunta de calcio y fosfato.

M significa matriz mitocondrial; MI es membrana interna; ME membrana externa; C crestas mitocondriales; GE granulos electrodensos.

en contraste a la acumulación masiva (15). La acumulación con concentraciones relativamente bajas de calcio externo era igualmente sensible a varios desacoplantes (DNP, FCCP, gramicidina y dicumarol), a inhibidores respiratorios ( $\text{CN}^-$ , antimicina) si la fuente de energía era sustrato oxidable y al inhibidor de la ATPasa, oligomicina, si la hidrólisis de ATP era la única fuente de energía (10). Aunque estos primeros estudios sobre la entrada de calcio apoyada por ATP (10, 14), se llevaron con concentraciones de calcio relativamente bajas (1-3 mM), éstas seguían siendo altas, pues el control respiratorio desaparecía (14). Bielawski y Lehninger (17) utilizaron concentraciones mucho más bajas (80 nmol/mg), las cuales habían sido sugeridas anteriormente (15) como las más adecuadas para observar estequiometrías exactas entre el transporte de  $\text{Ca}^{++}$  y el transporte de electrones, en ausencia de Pi y ATP y en donde el control respiratorio no llegaba a desaparecer. En estas condiciones se observó la misma respuesta para desacoplantes y oligomicina, pero aurovertina no inhibió ni en presencia o ausencia de antimicina. El atractilosido inhibía sólo cuando era acompañado de antimicina. La estequiometría  $\text{Ca}^{++}/\text{O}$  con y sin Pi en el medio fue la misma (ver Tabla 2).

La adición de un pulso de calcio (158 nmol/mg) a una suspensión de mitocondrias en estado 4, resultaba en un estado de alta fluorescencia de los nucleótidos de piridina (oxidación) y, un segundo pulso consecutivo, provocaba solo una ligera respuesta de fluorescencia (16). Con estos datos Chance sugi-

rió que la reacción del calcio con la mitocondria, consistía de dos eventos diferentes: uno inicial, donde el calcio entraría a la mitocondria y, otro final, donde el calcio ejercía su efecto desacoplante. Este último efecto observado por Chance fue comprobado por Rossi y Lehninger (15). Ellos habían notado que la adición secuencial de 150  $\mu\text{M}$  de calcio y luego de  $\text{ADP} + \text{P}_i$  no alteraba el control respiratorio ni desacoplaba la  $\text{F}_0$ . Pero, si añadían simultáneamente calcio más  $\text{ADP}$ , observaban que la respiración era estimulada con una velocidad característica de la estimulación por calcio y luego había una segunda pendiente, la cual era característica de la  $\text{F}_0$ ; es decir, el calcio era acumulado antes de que pudiera realizarse la  $\text{F}_0$  (aún cuando el calcio añadido era de 10  $\mu\text{M}$  o menos y el  $\text{ADP}$  100 veces mayor). También repitieron la importante observación original de Brierley et al (10) sobre la expulsión de  $\text{H}^+$ , pero ahora en condiciones de acumulación limitada de calcio; la adición de  $\text{ADP}$  causaba una disminución de la cantidad de  $\text{H}^+$  y la adición de  $\text{Ca}^{++}$  incrementaba la cantidad de  $\text{H}^+$  en el medio de incubación (16).

#### Superestequiometría.

De los trabajos de Rossi y Lehninger (9) y Chance (16) se había llegado a la conclusión de que la estequiometría  $\text{Ca}^{++}/\text{O}$  era de 4.0 a 5.0 (ver Tabla 2) o de aproximadamente 1.7-2.0 para  $\text{Ca}^{++}/\text{sitio}$ , bajo ciertas condiciones: sustrato oxidable 5-10 mM, 80 mM  $\text{NaCl}$  o  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, fosfato 4.0 mM,

30°C y pH 7.5, pero cuando la concentración de NaCl o KCl se aumentaba a un valor de 240 mM o más o cuando el pH se elevaba de 7.0 a un valor de 8.0 y se incubaban las mitocondrias en ausencia de Pi, las relaciones  $\text{Ca}^{++}/\text{O}$  y  $\text{Ca}^{++}/\text{sitio}$  se incrementaban a valores de 8-10 y de 4-6, respectivamente. Esta condición llamada superestequiometría (SE) se analizó originalmente por Carafoli et al (18). Al añadir fosfato o acetato al medio de incubación, no se presentaba dicha superestequiometría bajo ningún cambio en la fuerza iónica o el pH, lo cual explicaba el hecho de que no se alterará la tasa  $\text{H}^+/\text{Ca}^{++}$  de su valor de 1.0 (y por tanto, no se veía SE), cuando la entrada de calcio era sostenida por la hidrólisis de ATP bajo estas particulares condiciones de superestequiometría. El aumento en los valores de  $\text{Ca}^{++}/\text{O}$  y  $\text{Ca}^{++}/\text{sitio}$  era un reflejo de la reducción en el intervalo de activación de la respiración después de la adición de calcio. Además, las condiciones que producían la SE no favorecía la absorción inespecífica de calcio a la mitocondria y no se debía el fenómeno a cambios en la osmolaridad del medio (sustitución de la sal por sacarosa). Las condiciones que producían la SE también producían un estado inhibido de la respiración luego de la primera adición de calcio, pues una segunda o tercera adición consecutiva de calcio ya no producía los cambios cíclicos reportados por Rossi y Lehninger (15). El estado inhibido no estaba asociado con un daño en el mecanismo de la  $\text{F}_0$  o del transporte de electrones (19). Estos autores sugirieron que el estado inhibido de la respiración en las condiciones

Tabla 2. Estequiometrías Calculadas para el Transporte de Calcio

Ca <sup>++</sup> /sitio	Técnica	Condiciones Experimentales	Referencia
1.5			Rossi y Lehninger (9)
2.0	Consumo de oxígeno Entrada de <sup>45</sup> Ca <sup>++</sup> Electrodo de vidrio	Acumulación masiva	Rossi y Lehninger (15)
		Acumulación masiva	Vercesi et al (59)
Ca <sup>++</sup> /H <sup>+</sup>			
1.0	Electrodo de vidrio Consumo de oxígeno y colorimétrica con azul de bromótímol	Acumulación masiva pero sin ATP	Chance (16) Bielawski y Lehninger (17) Rossi et al (27)
0.7	Igual	sin fosfato	Chance (16)
2.0	"	Acumulación masiva sin ATP	Vercesi et al (59)
Ca <sup>++</sup> /O			
4.5	ver arriba ( mismos autores)	ver arriba (con succinato)	Rossi y Lehninger (9)
5.0	"	"	Chance (16)

...11

4.0

"

"

Vercesi et al (59)

---

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$

3

Electrodo de Calcio  
Electrodo de Sodio

Acumulación  
limitada

Crompton et al (61)

---

$\text{Ca}^{++}/\text{Pi}$

1.7

Rossi y Lehninger (9)

1.6

Entrada de  $^{45}\text{Ca}^{++}$   
colorimétrica,  
Fosfato libre

Acumulación  
limitada

Bielawski y Lehninger (17)

---

de SE era semejante al estado 6 mitocondrial descrito por Chance (16), a pesar de que las condiciones de incubación hallan sido diferentes. También se ha propuesto que la SE puede deberse al eflujo continuo de calcio y no a que la relación  $\text{Ca}^{++}/\text{O}$  no sea estequiométrica (20).

#### El Transporte Mitocondrial de Calcio es por Medio de un Acarreador....

Los primeros ocho años de investigación sobre el transporte de calcio, a partir de los trabajos fundamentales de Vasington y Murphy (6a, 6b) y DeLuca y Engstrom (7), lograron una caracterización más o menos completa a las propiedades del sistema de transporte, principalmente del influjo y en mitocondrias de hígado de rata. Y a pesar de que ya Chance (14) había propuesto un mecanismo sobre la reacción del calcio con la mitocondria, no se habían realizado trabajos que se abocaran al estudio directo de los componentes y del mecanismo del transporte de calcio.

En 1969, Reynafarje y Lehninger (21) reportaron la existencia de dos clases de sitios membranales de enlazamiento de calcio, independientes del metabolismo. Utilizando una gráfica de Scatchard, encuentran que un tipo de sitios son de baja afinidad, con una concentración de 400 nmol/mg y una constante de disociación  $K_d$  de 100  $\mu\text{M}$  y el otro tipo de sitios de alta afinidad, con una concentración de 1.2 nmol/mg y una  $K_d$  de 0.025  $\mu\text{M}$ . Descubren que el número de sitios de baja afinidad aumenta con el pH, de aproximadamente 30 nmol/mg a pH 6.7 a cerca de 50 nmol/mg a pH 9.0; la afinidad de estos sitios tam-

bién aumenta unas tres veces en este rango de pH.

La unión del calcio a los sitios de alta afinidad es inhibida por dicumarol, DNP y FCCP, y no es afectada por antimicina, rotenona, KCN, aurovertina, oligomicina y valinomicina. Los cationes  $Zn^{++}$ ,  $Sr^{++}$ ,  $Mn^{++}$ , y  $Hg^{++}$  también inhiben el enlazamiento del calcio a los sitios de alta afinidad;  $Mg^{++}$  y  $K^+$  no afectan esta unión. Los sitios de baja afinidad, por lo tanto, muy bien pudieran ser los fosfolípidos y proteínas de la membrana y los sitios de alta afinidad ser identificados como acarreadores específicos de calcio inmersos en la membrana interna mitocondrial. Esta sugerencia ya había sido planteada por Mela (22). Esta investigadora observa que el ión lantano en una concentración de 0.08 nmol/mg prot. mit., inhibe totalmente la entrada de calcio dependiente de energía. Estas cantidades tan bajas de  $La^{3+}$  sugieren la participación de un acarreador específico de calcio. Scarpa y Azzone (23) reportaron, sobre esto mismo, que el efecto inhibitorio del  $La^{3+}$  sobre el enlazamiento del calcio, no cambiaba cuando la mitocondria era depletada de fosfolípidos por tratamiento con acetona. Sin embargo, la existencia de los sitios de alta afinidad fue cuestionada poco después por Ackerman et al (24) pues, al aumentar la concentración de antimicina más allá del rango utilizado por Reynafarje y Lehninger, observan la desaparición gradual de dichos sitios. Más aún, previendo que las elevadas concentraciones de antimicina produjeran un efecto desacomplante no deseado, utilizan N-oxo-2-heptil-4-hidroxiquinoleína

HOQNO, cuyo efecto es igual al de antimicina, pero sin producir efectos desacoplantes a elevadas concentraciones. Con este inhibidor también observan la desaparición de los sitios de alta afinidad. Al preincubar las mitocondrias por mas de un minuto, que es el tiempo general empleado (21, 28, 30-33), encuentran nuevamente la desaparición gradual de los sitios de alta afinidad; igual sucede al añadir el ionoforo de cationes X537A. Además, a la fecha, tampoco ha quedado claro en qué superficie de la membrana interna se une el calcio: si en la cara externa en la interna o en ambas.

De cualquier forma, existen otras evidencias que apoyan fuertemente la presencia de un acarreador:

a) el descubrimiento de que el colorante para mucopolisacáridos rojo de rutenio  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{OHCl}_2$ , inhibe específicamente y por completo el transporte de calcio sostenido tanto por oxidación de sustrato, como por hidrólisis de ATP en una concentración de 5 nmol/mg (25, 26) e impide el enlazamiento de calcio a los sitios de alta (87%) y baja afinidad (60%). Moore(25) y Rossi et al (27) propusieron que el acarreador hipotético debería ser una glicoproteína, en cuyo centro activo contendría mucopolisacáridos y donde habría una competencia entre el calcio y el RR. (rojo de rutenio),

b) las mitocondrias de varios organismos que mostraron las propiedades generales de acumulación masiva y limitada de calcio (ver Tabla I) también presentaban sitios de alta afinidad inde-

pendientes del metabolismo, excepto en levadura, musculo del ala de la mosca y en la mayoría de las plantas superiores (28, 29).

c) la purificación de algunas proteínas mitocondriales que presentan varias de las propiedades del transporte de calcio. Una glicoproteína de más de 150 kdaltones de peso molecular con sitios de enlazamiento de calcio de alta y baja afinidad, que son inhibidos por  $\text{La}^{3+}$  y RR pero no por DNP e inhibidores respiratorios. La concentración de los sitios de alta afinidad de esta proteína era de 1.47 a 48-70 nmol/mg y tenía una  $K_d$  de 0.7-4.0  $\mu\text{M}$ ; mientras que la concentración de los sitios de baja afinidad fue de 133 a 900 nmol/mg y la  $K_d$  de 690  $\mu\text{M}$  (30, 31). Una glicoproteína de 47 K conteniendo 72 nmol/mg y  $K_d$  de 0.1  $\mu\text{M}$  para los sitios de alta afinidad y 600 nmol/mg y  $K_d$  de 10  $\mu\text{M}$  para los sitios de baja afinidad, con la misma sensibilidad a  $\text{La}^{3+}$  y RR (32). Ambas glicoproteínas representaban el 0.5-1.0% del contenido total de proteínas mitocondriales. Más recientemente, se ha aislado una proteína de 3 K de mitocondrias de corazón de borrego llamada calciforina (33). Esta proteína tiene sólo una base de sitios de enlazamiento de calcio con una  $K_d$  de 5.2  $\mu\text{M}$  y una relación de 1 mol de  $\text{Ca}^{++}$  unido por mol de calciforina. Ensayando la capacidad de la calciforina de remover iones isotópicos de una fase acuosa a otra también acuosa a través de una fase de solvente orgánico (la cual es inhibida por  $\text{La}^{3+}$  y RR), Shamo et al (33) han proporcionado evidencia de que la calciforina puede ser efectivamente un acarreador específico de calcio.

d) las velocidades iniciales de la entrada de calcio medidas espectrofotométricamente con murexida, exhiben un comportamiento cinético característico de una molécula transportadora (34): (i) sigmoidicidad, indicadora de cooperatividad en el transporte, (ii) saturabilidad, con una  $V_{max}$  de 8-13 nmol Ca transportado/mg seg, (iii) una afinidad relativamente alta de  $60 \pm 10 \mu M$ , que descarta la posibilidad de unión inespecífica y (iv) 1.63 "sitios de acción" calculados por gráfica de Hill.

..... y es un Proceso Electrogénico Dependiente de Energía.

La hipótesis quimiosmótica establece que una condición esencial en la fosforilación oxidativa es la generación de un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial (35, 36). Los experimentos de Jagendorf y Uribe (37), Mitchell y Moyle (38, 39) y Skulachev y su grupo (40, 41) aportaron evidencias decisivas para la validación de esta hipótesis, y todos ellos indicaban el requerimiento de un gradiente electroquímico en forma de una diferencia de potencial o de una diferencia de pH a través de la membrana.

En las secciones anteriores de esta tesis se ha mencionado que el calcio sólo puede penetrar a la mitocondria y acumularse cuando existe la oxidación de algún sustrato o la hidrólisis de ATP. Estas dos condiciones han sido interpretadas a la luz de la hipótesis quimiosmotica como las responsables de generar un gradiente de protones (42). De esta forma, se había concluído que la entrada de calcio a la mitocondria era un proceso dependiente de energía, pero la naturaleza de esta entrada, en

cuanto a si era un proceso de intercambio con protones o con algún otro catión intramitocondrial o si era un proceso unidireccional, seguía siendo una incógnita.

Los experimentos de Scarpa y Azzone (23), Selwyn et al (43) y Rottenberg y Scarpa (44) arrojaron algunos datos sobre la naturaleza electrogénica o electroneutra de la entrada de calcio y su dependencia de energía. Esos datos son los siguientes: el calcio penetra en mitocondrias desenergizadas cuando se añade valinomicina y no penetra cuando la concentración de potasio externo es de 13 mM (23). La proposición inmediata fue la de un intercambio Ca/K dadas las semejanzas en las características cinéticas del influjo de calcio y el eflujo de potasio. Cuando se midió el hinchamiento producido, en mitocondrias desenergizadas, por la entrada de acetato y tiocianato de calcio, comparado con el reducido efecto del cloruro de calcio, se concluyó que el calcio entraba a la mitocondria sólo hasta que se formaba un gradiente electroquímico y que las únicas posibilidades para la entrada de calcio eran un uniport electrogénico o en intercambio con un  $K^+$  (43)\*.

No sólo la entrada de calcio está gobernada por la generación de una diferencia de potencial transmembranal (E), sino también la permanencia del ion en el interior de la mitocondria.

\* El acetato y el tiocianato son permeables y el  $Cl^-$  impermeable. El acetato difunde a través de la membrana como acético liberando el protón en la matriz, más alcalina, y precipitándose como sal de calcio, mientras que el protón neutraliza un hidróxido resultando en la generación de un gradiente electroquímico conforme va penetrando el acético. El tiocianato es permeable como anión.

La adición de FCCP, CCCP o DNP induce una rápida liberación del calcio interno. Lo mismo ocurre con la adición de valinomicina más 50 mM de KCl (43, 44).

Ya que el calcio penetra bajo distintas condiciones experimentales que involucran necesariamente el movimiento paralelo de potasio, podría concluirse que el calcio entra por un uniport electrogénico. Medidas de la estequiometría del transporte de calcio demuestran que el calcio se acumula en un flujo de carga no compensado (ver tabla 2 ). Utilizando una combinación de variación del  $\text{Ca}^{++}$  externo y de CCCP añadido, Crompton y Heid (45), logran mantener constante el calcio interno y mediante la relación:

$$\log (\text{Ca}^{++})_{\text{ext}} = -z \log \frac{(\text{Rb}^{+})_{\text{int}}}{(\text{Rb}^{+})_{\text{ext}}} + \log (\text{Ca}^{++})_{\text{int}}$$

calcularon una transferencia de carga neta de 2.

#### Transporte de Calcio en Mitocondrias de Corazón.

El estudio de las funciones y mecanismos de la mitocondria se ha realizado comunmente en aquellas extraídas de la viscera mayor del cuerpo, el hígado, simplemente por su elevado contenido en mitocondrias (30-35% del contenido total de proteína o  $8.7 \times 10^{10}$  mitocondrias por gramo de tejido fresco o aproximadamente 50 mg/gr de tejido seco) (46-48), alto rendimiento y facilidad de obtención. En principio, no habría razón para analizar las mitocondrias de otros tejidos, sino sola-

mente con fines comparativos y menos aún se justificaría utilizar mitocondrias de corazón como las preparaciones experimentales cotidianas, si en los pocos estudios en que se habían empleado, presentaban las mismas características funcionales que las mitocondrias de hígado (10, 13, 16, 28, 58) (ver adelante).

Algunas observaciones aisladas de tipo morfológico ya habían indicado que la situación en corazón era diferente a la de músculo esquelético en cuanto a la cantidad de retículo sarcoplásmico y de mitocondrias; el retículo sarcoplásmico cardíaco era relativamente escaso y cubría pobremente a las miofibrillas (49), el volumen ocupado por las mitocondrias era de aproximadamente 32% del volumen total del organo y había aproximadamente  $60 \times 10^{10}$  mitocondrias por cc de tejido (50), la cantidad de mitocondrias en corazón de rata, medida por el contenido y la actividad de citocromo oxidasa, es de aproximadamente 80 mg/gr de tejido seco (51). Por otro lado, ciertas evidencias de tipo farmacológico, señalan más directamente a la mitocondria como el organelo encargado de regular la actividad cardíaca. Los experimentos clásicos de Webb (52) sobre los efectos de inhibidores metabólicos y sustratos en corazón de conejo y los más modernos de Horn et al (53, 54) indican que el músculo cardíaco pierde su habilidad para contraerse y para responder a drogas cardíacas, cuando el metabolismo mitocondrial está inhibido y las reservas de ATP eran reducidas.

Uno y otro enfoque llevaron a Carafoli y colaboradores (55,

56) y a Haugaard et al (57) a proponer que la participación de la mitocondria en la contractilidad cardíaca estaba relacionada no tanto a su habilidad para formar ATP, sino en su capacidad de acumular y liberar iones, particularmente calcio.

Por lo tanto, faltaba determinar las características y mecanismos de la salida de calcio, pues al parecer, la entrada estaba más o menos comprendida. El primer estudio sistemático sobre la liberación de calcio en mitocondrias de corazón (56) reveló que el sodio añadido aún en muy bajas concentraciones (2-5 mM) era capaz de inducir una salida neta del calcio acumulado previamente, en presencia de RR. De los restantes cationes alcalinos sólo el litio exhibía un efecto semejante (✦). Las mitocondrias de hígado no eran susceptibles a la acción del sodio; el magnesio (5 mM) sólo era inhibidor del influjo de calcio en mitocondrias de corazón (ver Tabla 3 ). Estas eran las primeras diferencias interesante encontradas entre las mitocondrias de dos organos, pues, como ya se mencionó, ambas preparaciones presentan las mismas propiedades de acumulación masiva y formación de gránulos electrodensos (10, 13), de estimulación respiratoria por adición de calcio (16, 59), de susceptibilidad de inhibidores y desacoplantes, de presencia de sitios de alta afinidad independientes del metabolismo (28), de superestequiometría y de preferencia por la acumulación de calcio a la fosforilación de ADP (59). Pronto se reportaron otras diferencias: el calcio penetraba más rápidamente en mitocondrias de hígado pero era

✦ Una explicación de la aparente alta especificidad de los sistemas de transporte basada en las propiedades periódicas de los elementos fue propuesta por Carafoli y Crompton ( 56 ).

más inestable; había mayor número de sitios de alta afinidad en mitocondria de corazón, pero la  $K_d$  era un orden de magnitud mayor (60) (ver Tabla 3 ).

Durante los últimos años Carafoli, Crompton y col. han presentado una serie de evidencias que sugieren fuertemente la existencia de dos sistemas de transporte de calcio en mitocondrias de corazón y de otros tejidos:

1. El eflujo de calcio inducido por sodio es insensible a RR (6 ).

2. No hay movimientos netos de  $H^+$  durante la liberación de calcio inducida por sodio (61).

3. El eflujo de calcio es por un intercambio con el sodio añadido con una estequiometría de  $3Na^+/1Ca^{++}$  (61).

4. En ausencia de sodio, se observa un recambio entre  $Ca^{++}$  interno- $Ca^{++}$  externo, si se inhibe la entrada con RR, con una estequiometría de 1:1 (62).

5. Este recambio  $Ca^{++}$ - $Ca^{++}$  es inhibido a un 50% por la adición de sodio 12 mM. El eflujo de calcio producido por sodio decrece con el aumento en la concentración externa de calcio en el medio de incubación (62).

6. Graficando por Eadie-Scatchard ( $v/s$  vs  $v$ ) la velocidad de entrada de calcio a diferentes concentraciones de calcio, se obtienen dos sistemas cinéticamente diferentes cuando se incubaba con KCl: uno, con una baja  $V_{max}$  (antiport) y otro, que muestra cooperatividad y elevada  $V_{max}$  (uniport). En este caso, en ausencia de sodio, el antiport catalizaría el intercambio  $Ca^{++}$  -

Ca<sup>++</sup> (63).

7. La salida de calcio inducida por sodio es menos sensible que la acumulación a la inhibición por lantanidos. La inhibición de la salida es mayor conforme aumente el radio iónico del lantanido; para la entrada, la inhibición aumenta con la disminución del radio iónico (64).

Este mismo grupo de investigadores ha desarrollado la idea de que, en mitocondrias de corazón, cerebro, corteza suprarrenal, glándula parótida y músculo liso, el sistema de transporte de calcio esta asociado a un reciclaje de cationes a través de la membrana interna. Las hipótesis que han sido comprobadas a la fecha sobre el modelo del reciclaje (esquema I) se mencionan a continuación:

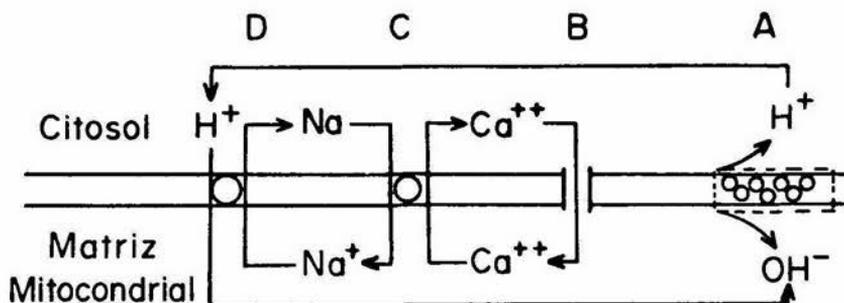
1. Ya que el influjo de calcio está conectado con la utilización de energía, el reciclaje de calcio a través de la membrana interna conduciría a un desacoplamiento, pues como se mencionó arriba, en corazón también las mitocondrias prefieren acumular calcio a fosforilar ADP. Esta premisa ha sido demostrada en mitocondrias de corazón, corteza suprarrenal y cerebro, pero no se observó en glándula parótida y músculo esquelético. El experimento es el siguiente: se mide la estimulación respiratoria producida por calcio en ausencia de sodio; al añadir el sodio, luego de que la mitocondria ha acumulado todo el calcio, no se observa el regreso al estado 4, sino una estimulación infinita (61, 65).

TABLA 3. Transporte de Calcio en Mitocondrias de Rata

Mitocondrias de Hígado	Mitocondrias de Corazón
<p>1. La vel. de entrada es de aprox. 2.5 nmol <math>^{45}\text{Ca}^{++}/\text{mg}</math> seg cuando la conc. externa de calcio es de 25 nmol/mg y de 5.0 nmol/mg seg cuando es de 50 nmol/mg (59).</p> <p>2. El calcio acumulado sólo es retenido por breve tiempo (con conc. externas mayores de 50 nmol <math>\text{Ca}^{++}/\text{mg}</math>, la cantidad de calcio que es retenida después de 3 min es menor del 5% del máximo acumulado (59).</p> <p>3. La conc. de los sitios de enlazamiento de calcio de alta afinidad es de 1.2 nmol/mg y de baja afinidad de 40-50 nmol/mg (21, 23).</p> <p>4. La constante de disociación de los sitios de alta afinidad es de 0.025 M (21)</p> <p>5. El <math>\text{Mg}^{++}</math> (5 mM) no tiene ningún efecto sobre el transporte de <math>\text{Ca}^{++}</math> (56, 59).</p> <p>6. El eflujo de calcio es por otra vía diferente a la vía de influjo, pero que no es activada por sodio (56, 63) y es insensible a RR.</p>	<p>1. La vel. de entrada es de aprox. 1.3 y de 3.0 nmol/mg seg cuando la conc. externa de calcio es de 25 y 50 nmol/mg respectivamente. (59)</p> <p>2. El calcio acumulado permanece por un periodo relativamente largo en el interior (con conc. externas mayores de 50 nmol <math>\text{Ca}^{++}/\text{mg}</math> la cantidad de calcio que es retenida después de 3 min es del 80% o más del máximo acumulado). (59).</p> <p>3. La conc. de los sitios de enlazamiento de alta afinidad es de 8 nmol/mg y de baja afinidad de 44 nmol/mg. (59).</p> <p>4. La constante de disociación de los sitios de alta afinidad es de 0.25 M. (59).</p> <p>5. El <math>\text{Mg}^{++}</math> (5 mM) inhibe el transporte de calcio (56, 59, 60).</p> <p>6. El eflujo de calcio es a través de una vía diferente a la vía de influjo, la cual es activada por sodio y es insensible a RR. (56, 59, 63).</p>

2. El eflujo de calcio provocaría la acumulación de sodio, pero este, a su vez, se intercambiaría con  $H^+$  externo, trayendo como consecuencia, el eflujo de  $H^+$  y aumento del pH externo o bien, eflujo de  $H^+$  y disminución del pH externo, si opera en forma reversible, el antiport  $H^+-Na^+$  (65-67).

ESQUEMA 1



Reciclaje de cationes en Mitocondrias de Corazón, Cerebro, Corteza Suprarrenal y posiblemente musculo esquelético y Glandula Parótida. A.-Generación de potencial transmembranal por la cadena respiratoria. B.-Influjo electroforético de calcio. C.-Intercambio sodio-calcio. D.-Intercambio sodio-proton. De Crompton et al (65).

Algunas otras propiedades interesantes del antiport  $Na^+/Ca^{++}$  son las siguientes: la  $V_{max}$  del sistema es de 14.3 nmol/mg min graficando  $1/v$  vs  $1/(Na)^3$ . Otros valores son 10 nmol/mg min con una concentración externa de sodio de 10 mM y de 13 nmol/mg min con 20 mM de sodio externo (61). La liberación de calcio a través de este antiport es de 5.6 nmol/mg con 22 mM de sodio externo en mitocondrias desenergizadas, que comparada con la liberación en mitocondrias energizadas (15.2 nmol/mg min) indica una aparente dependencia de voltaje del eflujo de calcio (61). El K (60 mM) estimula el intercambio cerca de 3 veces (68).

El Transporte de Calcio en Mitocondrias de Corazón y la Actividad de ATPasa.

Recientemente, Gómez-Puyou et al (69-71) propusieron que la ATPasa mitocondrial tenía transiciones de un estado inactivo a uno activo o viceversa, que eran reguladas por varios factores:

1. El potencial transmembranal. Mitocondrias enteras o partículas submitocondriales incubadas previamente con sustrato oxidable, exhibían una elevada actividad de hidrólisis y de síntesis de ATP, comparada con la actividad mostrada por mitocondrias preincubadas con inhibidores respiratorios o desacoplantes.

2. El pH. La adición de nigericina o valinomicina no abatía por completo la actividad de la ATPasa estimulada por potencial; sólo cuando se añadían ambos ionóforos había una inhibición total de la actividad de la ATPasa.

3. La composición de adenín-nucleótidos. El aumento en la cantidad de ATP externo inhibía progresivamente la actividad de ATPasa estimulada por preincubación con sustrato oxidable (estado activo).

4. La cantidad de calcio intramitocondrial o acumulado. Si se permitía la acumulación previa de calcio, se observaba una inhibición de la actividad de ATPasa estimulada por potencial.

5. El inhibidor de la ATPasa. Al añadirlo a la mezcla de incubación había una inhibición marcada de la actividad de la ATPasa (hidrólisis y síntesis).

Estos investigadores postularon que la energización de

la mitocondria producía el desprendimiento del inhibidor de la ATPasa y que cualquier factor que aboliera la diferencia de potencial produciría de nuevo la unión del inhibidor a la enzima (estado inactivo). Se supuso que la acumulación de calcio promovía el enlazamiento del inhibidor y, por ende, la transición del estado activo al inactivo.

Es muy posible que el papel de la mitocondria en el ciclo de contracción-relajación del músculo cardíaco sea a través de regular la concentración de calcio en sarcoplasma y, en menor proporción, a través de suministrar suficiente carga energética en el momento adecuado. El primer punto, parece razonablemente probable, pues se ha establecido la existencia de dos sistemas de transporte de calcio: uno, para influjo y, otro, para eflujo. Para el segundo problema, se requería de que la ATPasa se encontrará en estado activo, lo cual implica que el calcio acumulado deba ser liberado.

Si bien es cierto que la acumulación de calcio puede ser mantenida por oxidación de sustrato o por hidrólisis de ATP (y al parecer también el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ ), se ha preferido utilizar el primer proceso. En el presente trabajo, se ha empleado el sistema de hidrólisis de ATP para estudiar el transporte de calcio en mitocondrias de corazón de rata, pues se pretende establecer interrelaciones con la actividad de ATPasa, al mismo tiempo que se desea caracterizar el transporte de calcio bajo estas condiciones experimentales de hidrólisis de ATP. Un trabajo semejante se ha realizado pero para la acumulación

masiva de calcio en mitocondrias de hígado (17). A pesar de que el eflujo de calcio inducido por sodio sólo es aparente cuando se ha añadido RR (56, 61), este sistema ofrece la ventaja de que el intercambio sodio-calcio es aceptablemente visible en ausencia del inhibidor del influjo.

## MATERIAL Y METODOS.

Los reactivos tris-ATP, tris-succinato, tris-fosfato se obtuvieron de Sigma Chemical Co. El  $^{45}\text{CaCl}_2$  utilizado fue obtenido de New England Nuclear. El Nagarse se adquirió de Enzyme Development Co. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

Obtención de mitocondrias de corazón de rata. El método utilizado para la extracción de mitocondrias de corazón fue el descrito por Vercesi et al (59). Este método tiene la ventaja sobre la técnica original (Tyler y Gonze 1967, Methods in Enzymology Vol. X pp 75) de que la proteasa(Nagarse) se incuba con el tejido completo antes de la homogenización sin exponer a las mitocondrias liberadas a su acción, como ocurría cuando la enzima se añadía durante la homogenización. Esta modificación produce preparaciones mitocondriales que acumulan eficientemente calcio y exhiben una preferencia por el transporte del ión que por fosforilar ADP, al añadir ambos en concentraciones que exceden las Kms de cada uno. Este resultado sugiere que las supuestas diferencias funcionales encontradas por Jacobus et al (60) entre mitocondrias de corazón y de hígado bien pudieron ser un artefacto del método de extracción. (Ver Tabla III de la Introducción).

Medición del Transporte de Calcio (26, 56, 60). Las mitocondrias se incuban en un medio de reacción estandar y a determinados intervalos de tiempo se toman alícuotas de 50-100  $\mu\text{l}$  y se filtran inmediatamente a través de filtros Millipore (diámetro del poro

0.45  $\mu\text{m}$ ) con una duración no mayor de 4-6 segundos. Los filtros se lavan rápidamente con una solución de sacarosa fría 250 mM y cuando se han secado completamente, se procede a cuantificar el calcio radiactivo en un contador de centelleo líquido (Chicago Nuclear), utilizando como líquido centelleante Aquasol (New England Nuclear) o Instagel (Packard Instrument Co). Cada experimento fue estandarizado al determinar la actividad total del  $^{45}\text{Ca}^{++}$  presente en una muestra de 100  $\mu\text{l}$  de medio de reacción total.

Actividad de ATPasa Mitocondrial. La actividad de ATPasa se midió por la aparición de fosfato libre en el medio, después de un periodo de incubación de 3 minutos, en un medio de "expresión de ATPasa" consistente de tris-ATP 3 mM pH 7.4 y FCCP 1  $\mu\text{M}$ , en un volumen final de 1 ml, con agitación constante a 30°C. La reacción se detenía con la adición de 0.2 ml de TCA 30%.

El medio de incubación estándar consistió de: sacarosa 250 mM, buffer tris-HCl pH 7.4 10 mM, tris-succinato 5 mM pH 7.4 o tris-ATP 3 mM pH 7.4 o ambos, según el experimento y rotenona 4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína mitocondrial. Donde se indica, se añadió rojo de rutenio 2 ng/mg de proteína mitocondrial y NaCl en diferentes concentraciones. Todas las soluciones se prepararon con agua bi-destilada o alcohol etílico absoluto, según el caso. Algunas soluciones se trataron previamente con chelex ácido y arsenazo para eliminar las impurezas de sales de calcio, como fueron sacarosa 250 mM y tris-HCl 10 mM, que eran las que proporcionaban el mayor volumen al medio de incubación.

Control respiratorio.- Algunas veces, inmediatamente después de la extracción de las mitocondrias y después de 7 horas, se midieron los consumos de oxígeno de las preparaciones mitocondriales utilizadas. El medio de incubación para determinar el control respiratorio fue el siguiente: sacarosa 50 mM, tris-HCl pH 7.3 12.5 mM, tris-fosfato 5 mM pH 7.3, KCL 50 mM, glutamato 5 mM pH 7.3, y malato 5 mM pH 7.3, en un volumen final de 3 ml, en un vaso adaptado especialmente a un electrodo de oxígeno (YSI-53), a 30°C.

El fosfato libre se determinó por el método de Sumner (1944, Science 100, 412).

La concentración de proteína mitocondrial se determinó con el método de Biuret, añadiendo desoxicolato de sodio 0.07%.

## RESULTADOS

El método modificado de Nagarse (59) utilizado en este trabajo proporcionó controles respiratorios en un rango de 3.0-5.0, como ya había sido reportado con anterioridad (59, 60). La producción de proteína mitocondrial con este método fue de 3.6-7 mg/corazón de rata de 200 a 250 grs. Las mitocondrias extraídas con este método podían permanecer hasta 4 horas en hielo sin que hubiera cambios significativos en la magnitud del calcio acumulado o modificaciones en los valores de control respiratorio hasta por 7 horas (no se midieron intervalos de tiempo más largos).

Eflujo de Calcio Mitocondrial Inducido por Sodio

El transporte de calcio en mitocondrias de corazón fue estudiado por primera vez por Brieley et al (10) bajo condiciones de acumulación masiva.

Belawsky y Lehninger (17) estudiaron el transporte de calcio a bajas concentraciones en un proceso dependiente únicamente de hidrólisis de ATP y Carafoli et al(56) observaron en mitocondrias de corazón de rata, la liberación de calcio mitocondrial inducido por la adición de sodio al medio de incubación. El estudio del eflujo de calcio inducido por sodio\* en un proceso dependiente de la hidrólisis de ATP, arrojaría datos que pudieran relacionar la actividad de la ATPasa mitocondrial con el transporte de calcio

---

\*A pesar de añadir una cantidad de rotenona apreciable ( $4 \mu\text{g}/\text{mg}$  por la contribución de sustratos endógenos y de ATP a la entrada de calcio llegaba a ser significativa: cuando se incubaba con  $40 \text{ nmol}/\text{mg}$  o  $100 \text{ nmol}/\text{mg}$ , había un 15-25% de la acumulación obtenida cuando se añadía succinato  $5 \text{ mM}$  después de 3 min; a los 5-6 min era de 8-12% (datos no graficados)

y la acción del sodio y daría evidencia sobre la posibilidad de que la mitocondria tuviera algún papel en la regulación de la actividad muscular cardiaca.

Como fue establecido por algunos investigadores (10, 15) la entrada de calcio a la mitocondria podía ser sostenida por oxidación de sustrato o por hidrólisis de ATP. En nuestro sistema experimental se han comprobado estas dos condiciones. En la figura 1 se observa que la acumulación de calcio (medida por retención de calcio radioactivo luego de filtración del medio de reacción en millipore 0.45 un diámetro) puede ser sostenida por oxidación de succinato y, en la figura 2, por hidrólisis de ATP, por al menos 6 minutos.

Como puede también notarse de la Fig. 1, el eflujo de calcio inducido por sodio llega a niveles de aproximadamente 1.0 nmol/mg de proteína mitocondrial cuando se utiliza el rojo de rutenio, que es un inhibidor de la entrada de calcio pero no de la salida (25-27). Si no se adiciona rojo de rutenio, todavía se observa una salida neta de calcio inducida por sodio. Es decir, aún sin cerrar la vía de entrada y permitiendo con esto, que exista un reciclaje de cationes (61, 65), el sodio es capaz de inducir una liberación neta de calcio.

Este efecto del sodio sobre el transporte de calcio también puede apreciarse a mayores concentraciones de calcio externo y en donde la acumulación es mantenida sólo por la hidrólisis de ATP. La Fig. 2 muestra que el calcio se acumula y alcanza un

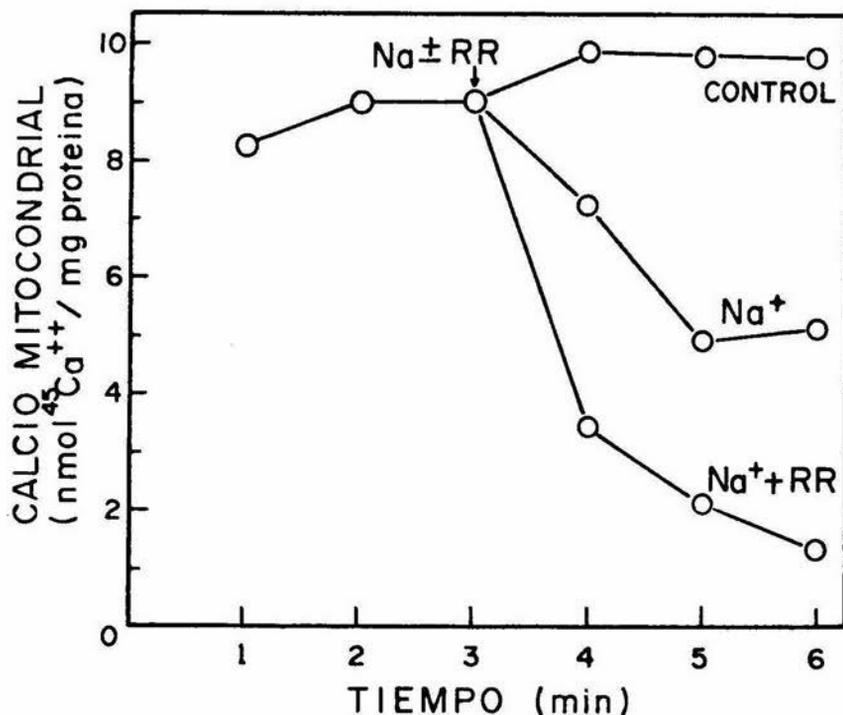


Fig. 1. Efecto del Sodio sobre el Transporte de Calcio Dependiente del Transporte de Electrones en Mitocondria de Corazón de Rata. El medio de incubación fue el siguiente: sacarosa 250 mM, buffer Tris-Cl 10 mM pH 7.4, Tris-succinato 5 mM pH 7.4, rotenona 4  $\mu$ g/mg de prot. mit. en un volumen final de 1 ml con agitación constante. El transporte de calcio se midió por la cantidad de radiactividad que permanecía en las mitocondrias luego de filtración de una alícuota de 100  $\mu$ l por millipore 0.45  $\mu$ . Al número 3 de incubación se añadió 100 mM de NaCl o rojo de rutenio 2 ng/mg prot. mas 100 mM NaCl. Donde dice control se añadió al min 3 un volumen igual al del NaCl pero de medio de incubación sin Ca<sup>++</sup> o de sacarosa fría. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos. La actividad específica del <sup>45</sup>Ca<sup>++</sup> en cada exp, era de aprox. 1uC y la cantidad de proteina mitocondrial empleada fue de 1mg/ml de medio de inc.

máximo aproximado a los 3 minutos\*; en este momento se añade sodio con y sin rojo de rutenio. A la concentración utilizada de calcio (100 nmol/mg) se observa una efectiva liberación de calcio.

La salida de calcio inducida por la adición de sodio puede depender de la concentración de calcio en el medio de incubación. En la Fig. 3, se muestra que al incubar a diferentes concentraciones de calcio la captación presenta dos picos, uno a 20 nmol/mg y otro a 70 nmol/mg de  $\text{CaCl}_2$ ; la liberación inducida por la adición de sodio después de 3 min de incubación, por su parte, presenta una disminución exponencial en el rango de 10-50 nmol/mg y después un pico a 70 nmol/mg. Como las concentraciones de calcio en el interior de la mitocondria son más bien en el rango de 10-50 nmol/mg (3, 6b), y ya que la captación de calcio tiene un máximo a 20 nmol/mg, se decidió utilizar esta cantidad de calcio en los experimentos posteriores. Así pues, al incubar mitocondrias con 20 nmol/mg de  $^{45}\text{CaCl}_2$  y añadir después de 3 minutos de incubación, diferentes concentraciones de sodio sin rojo de rutenio (Fig. 4), se observa una dependencia aproximada exponencial de la liberación de calcio acumulado, con una asintota o máximo de liberación entre 45-70 mM de NaCl. Estos dos experimentos sugieren, por lo tanto, que el eflujo de

---

\*Las concentraciones de calcio utilizadas a lo largo del trabajo están en el rango de la llamada acumulación limitada de calcio (15). En otros experimentos no mostrados, se observa, que al incubar a más altas concentraciones de calcio (100-500 nmol/mg) y, sin fosfato, ocurre una liberación espontánea de calcio alrededor de los 200 mol/mg, que aumenta de magnitud con el incremento del calcio extramitocondrial. Esta condición pudiera estar dañando a la mitocondria a nivel de membrana interna, puesto que el calcio que se acumula no va acompañado de anión permeante.

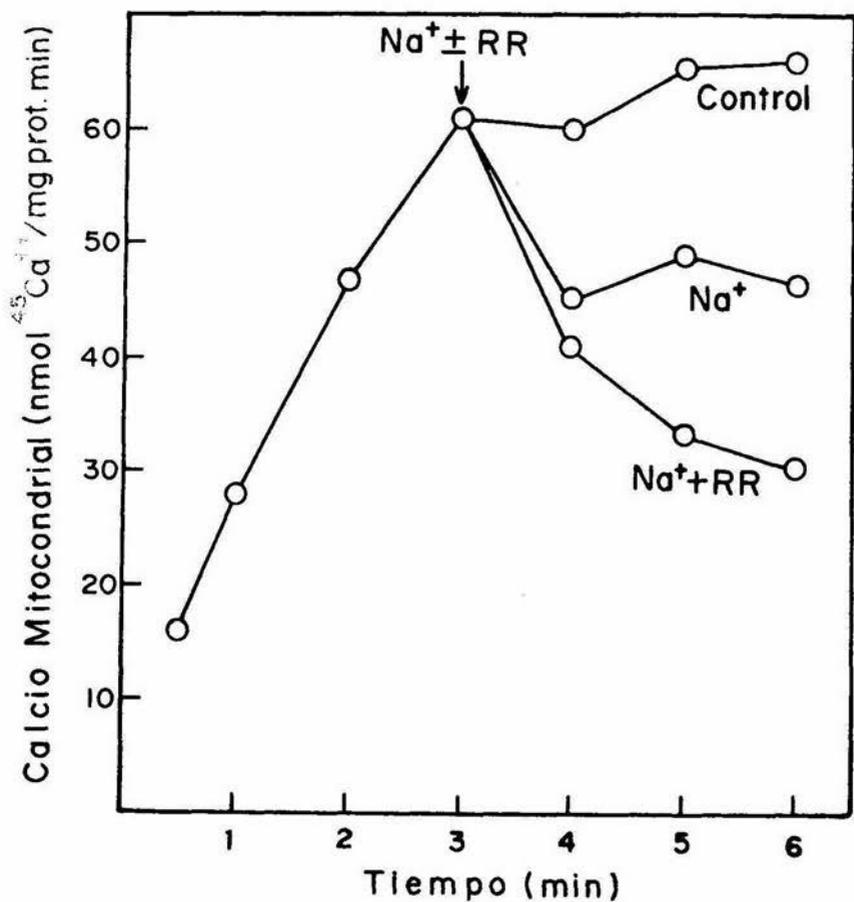


Fig. 2. Efecto del Sodio sobre el Transporte de Calcio Dependiente de la Actividad de ATPasa en Mitocondrias de Corazón de Rata. El medio de incubación fue el mismo que el de la Fig. 1, excepto que se añadió Tris-ATP 3.0 mM pH 7.4 en lugar del Tris-succinato y la concentración de calcio fue de 100 nmol/mg. Al minuto 3 de incubación se añadió NaCl 120 mM o rojo de rutenio 2 mg/mg mas NaCl 120 mM. En la curva control se añadió un volumen igual al del NaCl pero de sacarosa fria. Cada punto representa el promedio de 4 experimentos.

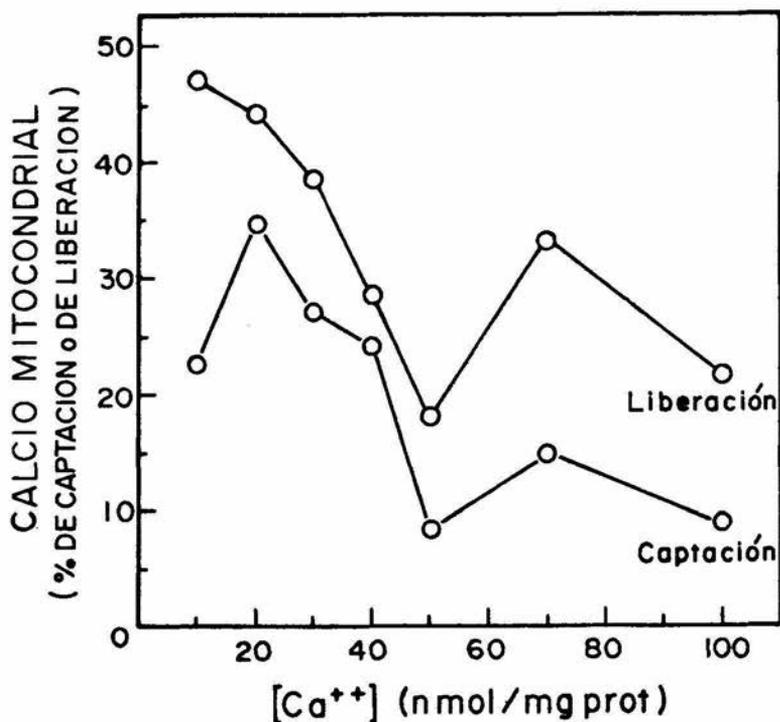


Fig. 3. Liberación de Calcio de Mitochondrias de Corazón de Rata Producida por Sodio a Diferentes Concentraciones Externas de Calcio. El medio de incubación fue el mismo que el de la Fig. 2. A los 3 minutos de incubación se añadió NaCl 60-100 mM o un volumen idéntico de sacarosa 250 mM fría. Se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l a los 3 y 5 minutos y se filtraron a través de millipore (0.45  $\mu$ m de diámetro). El dato porcentual de captación o liberación de calcio se calculó considerando que la cantidad de  $^{45}\text{Ca}^{++}$  que permanecía a los 3 min en las mitochondrias era de 100% de calcio acumulado.

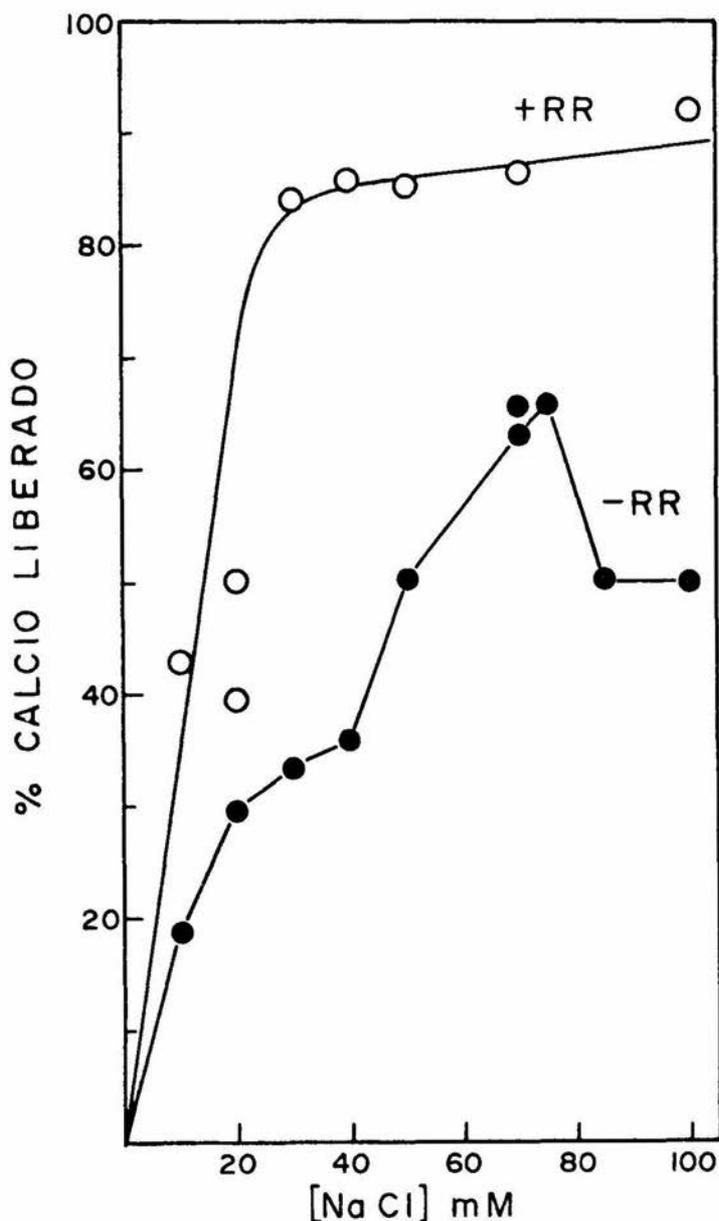


Fig. 4. Liberación de Calcio Producida por Diferentes Concentraciones de Sodio. El medio de incubación fue el mismo que el de la Fig. 2, excepto que la cantidad de calcio fue de 20 nmol/mg prot. A los 3 min de incubación se añadió la cantidad de sodio indicada. Se tomaron alícuotas de 50-100 $\mu$ l a los 3 y 5 min y se determinó  $^{45}\text{Ca}^{++}$  en un contador de centelleo líquido. La salida porcentual de calcio se calculó considerando que la cantidad acumulada a los 3 min era el 100% y mediante la fórmula :

$$\frac{([\text{Ca}^{++}] \text{ a los } 3' - [\text{Ca}^{++}] \text{ a los } 5') \times 100}{[\text{Ca}^{++}] \text{ a los } 3'} = \% \text{ liberación de calcio}$$

Cada punto representa el promedio de dos exps.

calcio inducido por sodio depende, de la cantidad de calcio previamente acumulado por mitocondrias de corazón de rata (en el rango de 10-50 nmol/mg).

Nuestro medio experimental carece de algunos factores que lo harían "más fisiológico": sustrato oxidable, fosfato inorgánico, potasio, por ejemplo. Además, la acción de otros cationes monovalentes sobre el eflujo de calcio, sólo ha sido determinada en una ocasión en un sistema soportado por succinato (56). En la Fig. 5 se muestra que el efecto de liberación de calcio es producido, además del sodio, por el litio, en una concentración de 57.5 mM. Observaciones no graficadas indican que las concentraciones mínimas requeridas de litio para producir un eflujo, en ausencia de rojo de rutenio, deben ser mayores de 22 mM. Esto quiere decir que cuando la cantidad de litio en el medio es menor de 22 mM, el calcio liberado es recapturado a una velocidad mayor y, por tanto, no se observa una salida neta de calcio sino una menor incorporación de éste, comparado con el control. Como cabía esperar de los restantes cationes alcalinos (K, Rb, Cs), estos no inducen la liberación de calcio, pero si exhiben una menor cantidad de calcio captado, comparado con el control. Al parecer, el modificar la tonicidad en 114 mosM y la fuerza iónica en 0.057, afecta ligeramente la captación de calcio.

Los resultados de la Fig. 5 sugerían pues que la composición del medio, en cuanto a osmolaridad y fuerza iónica, parecía ser importante en el fenómeno de eflujo de calcio mitocondrial. Si, en vez de añadir el catión hasta que el influjo alcanzaba un plateau,

se añadía desde el inicio de la incubación y si, además, se utilizaba la combinación succinato-ATP, podría amplificarse la respuesta de la mitocondria a la adición de diferentes cationes. La figura 6 muestra los resultados de este experimento. Cuando se incubaba KCl 100 mM con ATP 3 mM (curva I), la acumulación de calcio es mucho menor que la reportada en la Fig. 2, aproximadamente un 60% más bajo. Algo semejante pasa cuando en lugar de potasio, se incubaba con NaCl 100 mM (curva II), pero la acumulación es un 75% menor que el control reportado en la Fig. 2. Como el potasio no induce la liberación de calcio (Fig. 5), estos datos apoyan la idea de que la osmolaridad y la fuerza iónica tienen algún papel esencial en el transporte de mitocondrias de corazón de rata. Cuando se incubaba KCl o NaCl con succinato 5 mM o con succinato más ATP (curvas III-VI), se mantiene la proporción entre el efecto del potasio y el efecto del sodio sobre la acumulación de calcio (15%): el sodio inhibe a un mayor grado la entrada de calcio, lo cual significa que el sodio ejerce su efecto sobre el calcio acumulado como catión y a través de aumentar la fuerza iónica y la tonicidad del medio de incubación.

El efecto del fosfato inorgánico sobre el eflujo de calcio inducido por sodio lo podemos apreciar en la Fig. 7. Allí observamos que el fosfato 1 mM produce una más rápida acumulación de calcio, pero con el mismo nivel de saturación que se había determinado en ausencia de este anión (Fig. 2), de aproximadamente 65 nmol/mg. En cuanto al eflujo, el fosfato parece

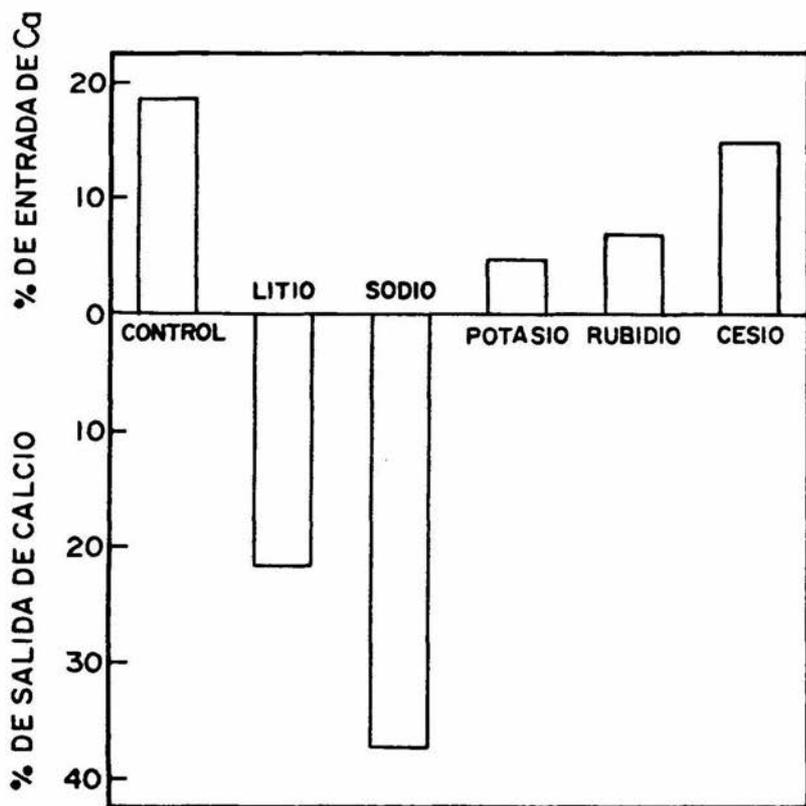


Fig. 5. Especificidad de la Activación del Eflujo de Calcio. El medio de incubación fue el mismo que el de la Fig. 4 (ó 3). A los 3 minutos de incubación se añadió la sal correspondiente en forma de cloruro en una concentración final de 56 mM. Se tomaron alicuotas de 100  $\mu$ l a los 3 y 5 min. de iniciada la reacción con la adición de mitocondrias al medio de incubación y se determinó  $^{45}\text{Ca}^{++}$  en un contador de centelleo líquido. El dato porcentual de entrada o de salida de calcio se calculó de la manera explicada en la figura anterior.

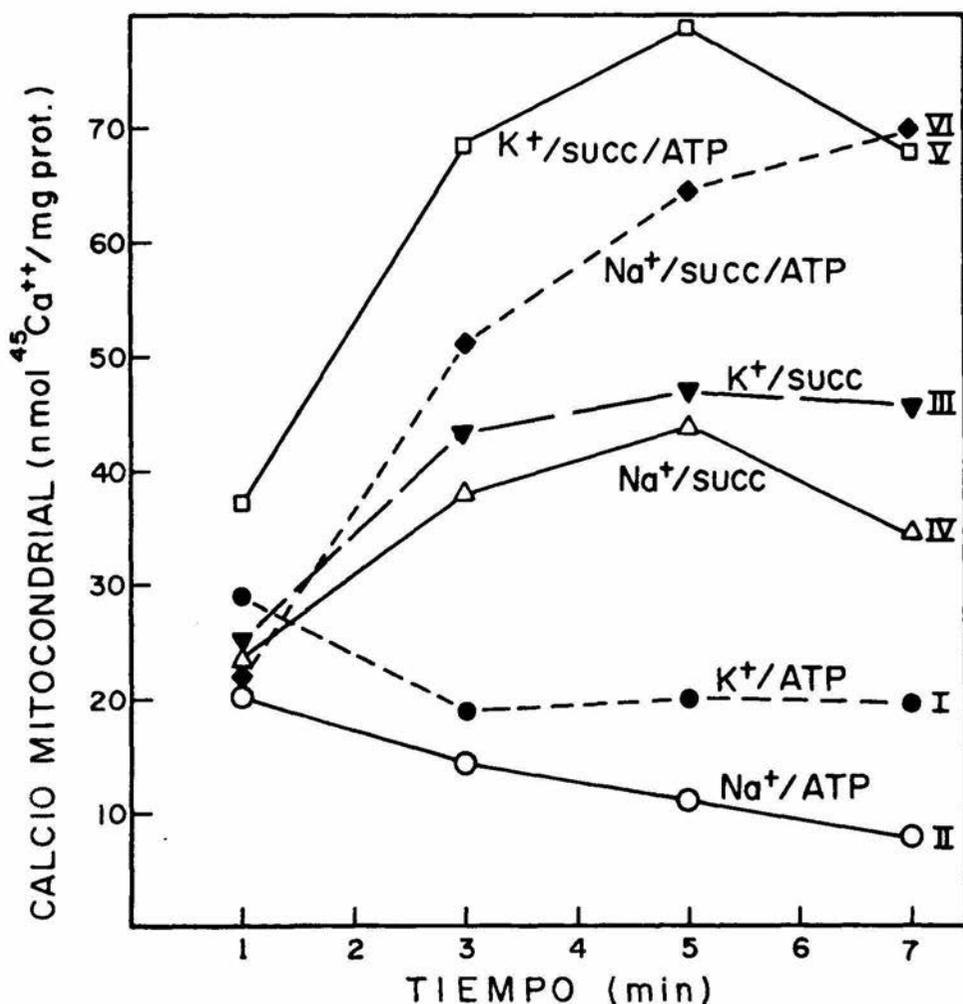


Fig. 6. Influencia de la Composición del medio en el Transporte de Calcio. El medio de incubación fue el mismo que de la figura 2. Las demás condiciones experimentales también se especifican en la figura 2. Además de los componentes estándares del medio, excepto ATP, se añadieron las siguientes mezclas: curva I, KCl 100 mM más Tris-ATP pH 7.4, 3mM; curva II NaCl 100 mM más tris-ATP; Curva III KCl más tris-Suc. 5 mM pH 7.3; curva IV, NaCl más tris-cuss; curva V KCl, Tris ATP y Tris-succ; curva VI NaCl, tris-ATP, y tris SUCC. Cada punto representa el promedio de dos experimentos.

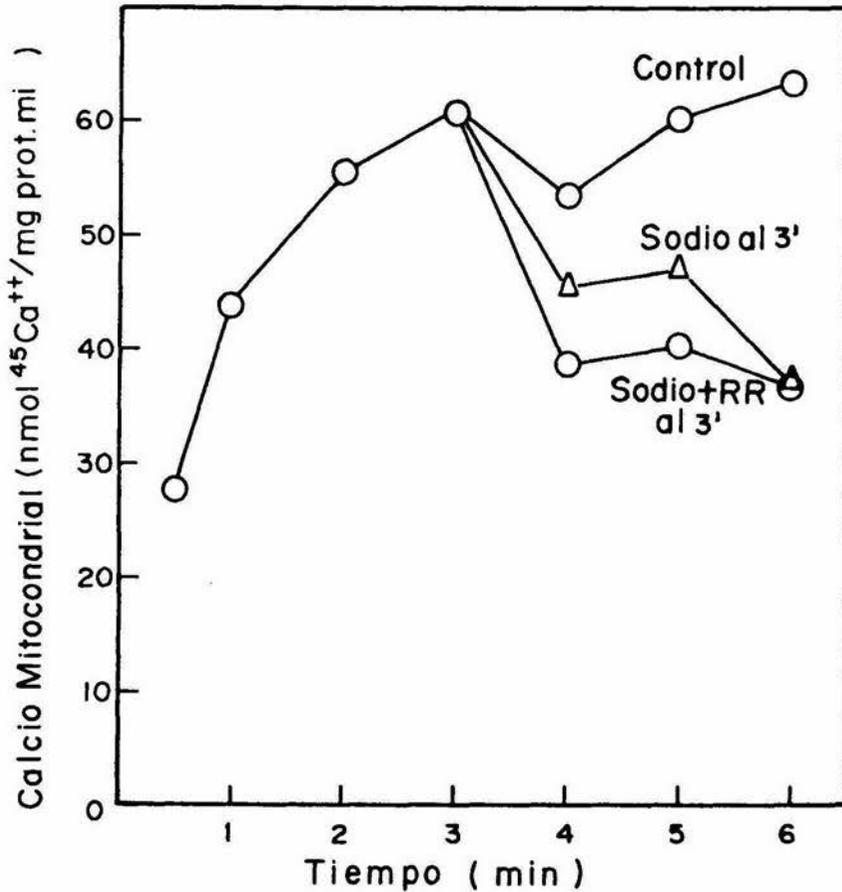


Fig. 7. Influencia del Fosfato en el Transporte de Calcio. El medio de incubación fue el siguiente: sacarosa 250 mM Tris-HCl 10 mM pH 7.4 rotenona  $4 \mu\text{g}/\text{mg}$  prot, tris-ATP 3 mM pH 7.4,  $^{45}\text{CaCl}_2$   $100 \mu\text{M}$  (100 nmol/mg) 1 mg de mitocondrias y tris-fosfato 1 mM pH 7.3, en un volumen total de 1 ml, con agitación constante a  $30^\circ\text{C}$ . El procedimiento experimental para la medición del  $^{45}\text{Ca}^{++}$  fue el mismo explicado en la sección de material y métodos y en la figura 1. A los 3 minutos de incubada la reacción con la adición de mitocondrias, se agregó NaCl 100 mM solo o con rango de rutenio 2 mg/mg. Cada punto representa el promedio de al menos 3 experimentos.

no tener ningún efecto, ni en la velocidad de salida ni en la cantidad de calcio liberado, aunque la diferencia al minuto 6 entre la ausencia y presencia de rojo de rutenio es mínima.

#### Actividad de ATPasa Durante el Eflujo de Calcio

La acumulación masiva de calcio, entre otros de sus efectos, estimula la actividad de ATPasa (10). Pero no se ha reportado si hay algún efecto de la acumulación de bajas concentraciones de calcio sobre la actividad de ATPasa, ni tampoco se ha estudiado la relación entre el eflujo de calcio inducido por sodio y la actividad de ATPasa mitocondrial. Si el calcio penetra a la mitocondria en un proceso electrogénico dependiente de energía proveniente de la oxidación de sustrato o de la hidrólisis de ATP (23, 43, 44) y en ausencia de anión permeable acompañante, cualquier efecto sobre la actividad de ATPasa al aumentar o disminuir la cantidad de calcio intramitocondrial, estará mediado por el ión  $\text{Ca}^{++}$  y no por alguna sal de calcio que se pudiera formar o por abatimiento del gradiente electroquímico.

Cuando se incuban mitocondrias con 20 nmol  $\text{Ca}^{++}$ /mg en ausencia o presencia de 50 mM de NaCl, no hay diferencias en el curso temporal de la hidrólisis de ATP (Fig. 8). Aparentemente, el sodio no causa ninguna alteración en la cinética de hidrólisis de ATP.

La actividad de la ATPasa mitocondrial depende de que se encuentre en un estado "activo" o en un estado "inactivo" (69). La transición de uno a otro estado depende del grado en que la

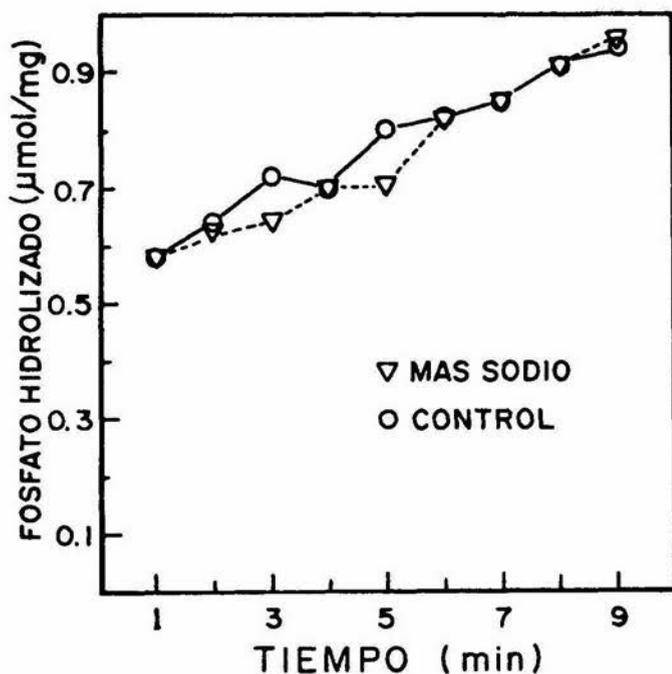


Fig. 8. Efecto del Sodio en el Curso Temporal de la Hidrólisis de ATP. El medio de incubación fue el siguiente: Tris-ATP 3 mM pH 7.4, sacarosa 240 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.4, rotenona 4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot,  $\text{CaCl}_2$  20  $\mu\text{M}$  (20 nmol/mg) y 10 mg de mitocondrias en un volumen final de 10 ml, con agitación constante a 30°C. Se tomaron alicuotas de 1 ml cada minuto luego de la adición de las mitocondrias y se paro la reacción con TCA 5-6%. La hidrólisis de ATP se determinó por la aparición de fosfato libre por el método de Summer modificado (1944). La curva experimental contenía NaCl 50 mM.

mitocondria halla sido energizada o denenergizada. Un método útil para expresar al máximo la actividad de ATPasa en uno u otro estado ha sido desarrollado por Gómez-Puyou et al (71) Este método consiste en incubar a las mitocondrias en las condiciones experimentales que se desee, extraer alicuotas a diferentes tiempos y reincubar en un medio que contenga el desacoplante FCCP (1  $\mu$ M) y ATP (3mM) durante 3 minutos, parar la reacción con TCA 6% y determinar fosfato inorgánico libre.

En un experimento típico con el medio de incubación detallado en la Fig. 8, al incubar las mitocondrias con FCCP más ATP, se obtenía una cantidad de fosfato hidrolizado 3-5 veces mayor, que cuando se determinaba directamente del medio experimental.

En la Tabla I se muestra la actividad de ATPasa (medida como se detalló arriba) durante el transporte de calcio, cuando se adiciona sodio 100 mM o potasio 100 mM después de 3 minutos de acumulación. Como se sugirió de la Fig. 8, el sodio (y, en este caso, ni el potasio) no parece tener algún efecto sobre la actividad de la ATPasa de mitocondrias de corazón de rata.

En la primera parte de este trabajo se demostró que el sodio inducía la salida de calcio a pesar de que había energía para seguir acumulándolo. Una explicación es la de que la velocidad de intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  sea mayor que la entrada electroforética de calcio. Otra explicación es que el calcio libre en la matriz mitocondrial podría ejercer un efecto inhibitorio sobre la ATPasa y que esta inhibición no produce a su vez una

TABLA I

Efecto del Sodio y Potasio sobre la Actividad de ATPasa

	Actividad de ATPasa ( mol/mg - min)	
	3'	5'
Control	0.45 ± 0.02	0.46 ± 0.01
Sodio 100mM al 3'	0.47 ± 0.03	0.44 ± 0.08
Potasio 100mM al 3'	0.48 ± 0.02	0.44 ± 0.08

El medio de incubación fue el mismo que el de la Fig. 8. La medición de la actividad de ATPasa se realizó como está especificado en la sección de Materiales y Métodos. Se tomaron alicuotas de 1 ml a los 3 y 5 minutos luego de la adición de las mitocondrias y se reincubaron por 3 minutos en un medio que consistía de Tris-ATP 3 mM pH 7.4 mas FCCP 1  $\mu$ M; la reacción se paraba con TCA 5-6%. De esta ultima mezcla se tomaban 0.5 ml, luego de centrifugación, y se determinaba el fosfato inorgánico del sobrenadante por el método de Sumner modificado (1944). Las sales se añadieron después de los 3 minutos iniciales de incubación en una concentración final de 100 mM. Cada dato representa el promedio de 3 experimentos. La desviación estandar se calculó con la fórmula estudiada y recomendada por Parker (Estadística para Biólogos. Omega, Barcelona, 1971) 
$$S = \sqrt{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}{n-1}}$$

liberación espontánea de calcio. En la tabla II se describe la actividad de ATPasa medida con diferentes iones y mezclas de iones. Como se puede notar, nuevamente no hay un efecto claro del sodio o potasio sobre la enzima. Sin embargo, la incubación con calcio (100 nmol/mg) presenta una ligera inhibición de la actividad de la ATPasa, aproximadamente del 25%, que fue consistente en todos los experimentos realizados. Más aún, la combinación del calcio con sodio o potasio, también presenta una ligera inhibición de la actividad de ATPasa, comparada con el control, que es un medio depletado de sodio, potasio o calcio.

Para determinar de un modo más preciso el efecto del calcio sobre la ATPasa, se midió la actividad de la enzima a diferentes concentraciones de calcio en el medio de incubación (Tabla III). Puede observarse que si el calcio ejerce algún efecto sobre la ATPasa, a 10-20 nmol/mg, ya ha saturado los sitios de acción, pues a mayores concentraciones no se ve ningún aumento o disminución significativa de la actividad de ATPasa.

TABLA II

Efecto del Calcio, Sodio y Potasio Sobre la Actividad de ATPasa

Adiciones al medio de inc.	ACTIVIDAD DE ATPasa ( $\mu\text{mol} / \text{mg} \times \text{min}$ )	
	3'	5'
Control	0.32 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.04
Calcio 100 mol/mg	0.25 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.04
Potasio 100 mM	0.35 $\pm$ 0.04	0.34 $\pm$ 0.05
Sodio 100 mM	0.36 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.05
Calcio 100 nmol/mg + Potasio 100 mM	0.27 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.07
Calcio 100 nmol/mg + Sodio 100 mM	0.29 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.01

El medio de incubación fue el mismo que el de la Fig. 6 excepto que no contenía  $\text{CaCl}_2$ . Las adiciones a este medio de reacción se hicieron desde el inicio de la incubación, la cual empezaba al agregar las mitocondrias. La actividad de ATPasa se determinó de la forma especificada en la Tabla II. Cada dato representa el promedio de 4-5 experimentos.

TABLA III

La Actividad de ATPasa a Diferentes Concentraciones de Calcio

Ca <sup>2+</sup> nmol/mg	μmol Pi hidrolizado/mg min	
	3'	5'
	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.03
10	0.35 ± 0.07	0.35 ± 0.06
25	0.33	0.28
30	0.37 ± 0.01	0.40 ± 0.01
40	0.28	0.33
50	0.41 ± 0.02	0.35 ± 0.03
100	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.04

Las condiciones experimentales fueron las mismas de la Fig. 6 y Tabla II, excepto que el calcio se fue variando como se indica. La actividad de ATPasa se midió de la misma manera ya especificado en la Tabla II. Cada dato representa el promedio de 4-5 experimentos.

## DISCUSION

Hemos podido observar que la adición de sodio a un medio de incubación con mitocondrias de corazón de rata, libera calcio previamente acumulado, sin necesidad de añadir rojo de rutonio, que es un inhibidor de la entrada electroforética unidireccional (25, 26) pero no del intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ . Las concentraciones óptimas de sodio y calcio encontradas para este proceso son de 10-50 nmol  $\text{Ca}^{++}$ /mg y de 45-70 mM de NaCl y los experimentos de las figuras 3 y 4 sugieren que el eflujo de calcio inducido por sodio depende de las concentraciones de ambos iones. El fosfato inorgánico (1 mM) no parece tener ningún efecto sobre la velocidad o cantidad de calcio acumulado o liberado por efecto del sodio, pero al modificar la osmolaridad y la fuerza iónica del medio, si se notó un ligero cambio en la cantidad de calcio acumulado. La especificidad del fenómeno está restringida a litio y sodio; potasio, rubidio y cesio no afectan. La acción del sodio radica no solo en el radio iónico, de valor casi igual al del calcio (0.95 y 0.99 Å respectivamente) ni en la electronegatividad (0.9 y 1.0, respectivamente), sino que existe también una contribución aunque no grande si significativa de la osmolaridad y la fuerza iónica. La participación del radio iónico, la electronegatividad y el arreglo estereoquímico de las moléculas ha sido considerado por Crompton y Carafoli (58) como factores importantes en la selectividad de cationes.

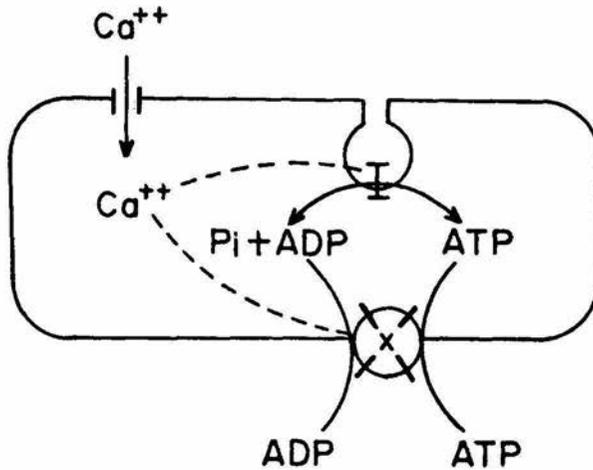
Para nuestro sistema experimental, la actividad de ATPasa era la única fuente de energía que mantenía la acumulación de calcio. Nuestro objetivo al medir la actividad de esta enzima era el de observar la dependencia del eflujo de calcio inducido por sodio de la actividad de ATPasa. Se pudo apreciar que ni el sodio ni el potasio tenían alguna influencia sobre esta actividad enzimática pero el calcio si reducía en un 25% constantemente la actividad de ATPasa después de 3 minutos de incubación, a una concentración mínima de 10-20 nmol/mg.

Carafoli et al (56) utilizando sustrato oxidable como fuente de energía, solo observaron una ligera salida de calcio inducida por sodio; se requería de la adición de RR para volver aparente el evento. Nosotros hemos extraído mitocondrias con el método de Nagarse modificado (59) y no hemos observado la misma pobre salida de calcio (ver Fig. 1). Sin embargo, este dato no es definitivo, pues en algunos experimentos (no reportados) con altas concentraciones de calcio (100 nmol/mg), se encontraron oscilaciones en la cantidad de calcio interno de varios minutos de incubación. En nuestro sistema de acumulación de calcio dependiente de hidrólisis de ATP no importaba que la cantidad de calcio añadido fuera elevada pues, sin agregar RR, se apreciaba claramente la liberación de calcio inducida por sodio, hasta alcanzar un nuevo equilibrio.

La entrada de calcio sostenida por sustrato oxidable tiene una velocidad de 150 nmol/gr seg con 10  $\mu$ M de calcio externo (72).

La salida de calcio a través del antiport es de 15.0 nmol/mg min (61 y este trabajo). Considerando que hay aproximadamente 100 mg de proteína mitocondrial/gr de tejido seco cardiaco (49), la velocidad de eflujo de calcio sería de aproximadamente 25 nmol/gr seg o sea 6 veces menor que la entrada. Es posible que en el medio de acumulación sostenido por sustrato oxidable la salida no pueda ser muy aparente, pues la entrada es más veloz e inmediatamente sería cubierto el "hueco" dejado por el calcio expulsado a través del antiport. En el medio sostenido por ATP, la salida se vuelve más aparente, probablemente porque el calcio acumulado ha ido promoviendo la asociación del inhibidor a la ATPasa (71) y consecuentemente, inactivándola, con lo cual la entrada se reduciría por falta de suficiente energía (y tal vez por la inhibición de magnesio). Una posibilidad complementaria sería la de que el calcio acumulado inhibiera la actividad de la translocasa de adenín-nucleótidos (73), facilitando de esta forma la medición de la salida, pues la ~~entrada~~ se reduciría por la disminución en la actividad de la ATPasa a causa de la inhibición sobre la translocasa (ver esquema II). Los datos sobre la actividad de la ATPasa de este trabajo encuadran en cualquiera de estas dos explicaciones. Al incubar con calcio había una inhibición de la ATPasa que no reproducían ni sodio ni potasio.

Por otro lado, la observación de que el calcio puede ser liberado en ausencia de RR apoya la idea de que la mitocondria participa en la regulación de la actividad cardiaca (55-57),



La Interrelación entre el Transporte de Calcio, la ATPasa y la Translocasa de adenín-nucleótidos. El calcio que se ha acumulado promueve la unión del inhibidor a la  $F_1$ -ATPasa y además inhibe la actividad de la translocasa de adenín-nucleótidos. I. significa inhibidor de la ATPasa.

pues es claro que estos eventos se realizan sin existir inhibidores metabólicos de esta naturaleza. Además, se ha demostrado que la mitocondria remueve más rápidamente el calcio de la troponina que el retículo sarcoplásmico (74.)

Un modelo para la participación de la mitocondria en la actividad cardíaca debe considerar que durante la relajación, los niveles de sodio y calcio son relativamente bajos en el sarcoplasma. Entonces, en mitocondria, el calcio estaría acumulado y, en consecuencia, la ATPasa y la Translocasa tendrían baja actividad. La llegada de un impulso nervioso, ocasionaría que el sodio extracelular penetrará hacia el sarcoplasma y, con esto, el calcio intramitocondrial saldría en intercambio con sodio. El calcio liberado sería empleado por la miosina para la contracción muscular. Conforme vaya saliendo el calcio, el inhibidor se desprendería de la ATPasa, la cual, a su vez, pasa al estado activo. Durante la contracción, la mitocondria sinte-

tizaría ATP que sería intercambiado a través de la translocasa con el ADP producido por la miosina durante la contracción. La cadena respiratoria durante todo el ciclo de contracción-relajación sería la responsable de generar energía consumible para la acumulación y liberación de calcio.

Algunas objeciones al modelo son: (a) la velocidad de eflujo en condiciones óptimas es muy reducida, porque se ha calculado que la cantidad de calcio requerida para la actividad del músculo cardiaco es de 170-500 nmol/gr seg (49.75). Este requerimiento sólo sería cubierto por el proceso de acumulación (y eso suponiendo que el magnesio no ejerce su efecto inhibitorio), pero no por el de liberación, a menos que las mitocondrias se encontraran concentradas cerca de las miofibrillas; (b) la cantidad de sodio requerida para eflujo máximo es alta ( $> 25\text{mM}$ ) y se ha calculado que el influjo de sodio extracelular aumenta la concentración intracelular no más de  $0.5\text{ mM}$  (61). Pero es probable que el sodio penetre sólo en ciertas zonas y la concentración real sea mayor (por ejemplo, cerca de las mitocondrias). A pesar de esto, el modelo propuesto ofrece alternativas y correlaciones interesantes para el desarrollo de futuros trabajos.

Finalmente cabe mencionar que el efecto producido por la osmolaridad y la fuerza iónica es semejante en naturaleza, a fenómenos de superestequiometría (ver la Introducción), todavía no suficientemente investigado. Por lo tanto, resultaría atractivo analizar el mecanismo de transporte bajo esta perspectiva o con cualquiera de los enfoques ya mencionados.

## BIBLIOGRAFIA

1. Potter, V.R. (1947) J. Biol. Chem. 169, 17.
2. Lehninger, A.L. (1949) J. Biol. Chem. 178, 625.
3. Slater, E.C. y K.W. Cleland (1953) Biochem. J. 55, 566.
4. Potter, V.R., P. Siekevitz y H.C. Simonson (1953) J. Biol. Chem. 205, 893.
5. Chance, B. (1955) Citado en Chance, B. (1965). Ver referencia 16
- 6a. Vasington, F.D. y J.V. Murphy (1961) Fed. Proc. 20, 146.
- 6b. Vasington, F.D. y J.V. Murphy (1962) J. Biol. Chem. 237, 2670.
7. DeLuca, H.F. y G.W. Engstrom (1961) Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 1744.
8. Wojtczak, L. y A.L. Lehninger (1961) Biochem. Biophys. Acta 51, 442.
9. Rossi, C.S. y A.L. Lehninger (1963) Biochem. Z. 338, 698.
10. Brierley, G.P., E. Murer y E. Bechmann (1964) Arch. Biophys. Bioch. 105, 89.
11. Greenawalt, J.W., C.S. Rossi y A.L. Lehninger (1964) J. Cell Biol. 23, 21.
12. Peachey, L. (1964) J. Cell. Biol. 20, 95.
13. Brierley, G.P. y D.B. Slautterback (1964) Biochem. Biophys. Acta 82, 182
14. Legato, M.S., D. Spirito y G.A. Langer (1968) J. Cell. Biol. 37, 1
15. Rossi, C.S. y A.L. Lehninger (1964) J. Biol. Chem. 239, 11.
16. Chance, B. (1965) J. Biol. Chem. 240, 2729.
17. Bielawski, J. y A.L. Lehninger (1966) J. Biol. Chem. 241, 4316.
18. Carafoli, E., R.L. Gamble y A.L. Lehninger (1965) Biochim. Biophys. Res. Comm. 21, 215.

19. Carafoli, E., R.L. Gamble, C.S. Rossi y A.L. Lehninger (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 1199.
20. Rossi, C.S., J. Bielawski, E. Carafoli y A.L. Lehninger (1966). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 22, 206.
21. Regnofarje, B. y A.L. Lehninger (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 584.
22. Mela, L. (1968) *Arch. Biochem Biophys.* 124, 286.
23. Scarpa, A. y G.F. Azzone (1970) *Europ. J. Biochem.* 12, 328.
24. Akerman, K.E., N.E.L. Saris, J.L. Jarvisalo (1974) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 58, 801.
25. Moore, C.L. (1971) *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 42 298.
26. Vasington, F.D., P. Gazzotti, R. Tiozzo y E. Carafoli (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 256, 434.
27. Rossi, C.S., F.D. Vasington y E. Carafoli (1973) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 50, 845.
28. Carafoli, E. y A.L. Lehninger (1971) *Biochem. J.* 122, 681.
29. Chen, Ch.H. y A.L. Lehninger (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 157, 183.
30. Lehninger, A.L. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Comm* 42, 312
31. Gómez-Puyou, A., M. Tuena de Gómez-Puyou, G. Becker, y A.L. Lehninger (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 47, 814.
32. Sottocgsa, G., G. Sandri, E. Carafoli, B. Bernard, P. Gazzorri, F.D. Vasington y E. Carafoli (1972) *Biochem. Biophys Res. Comm.* 47, 808
33. Jeng, A.Y. y A.E. Shamoó (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 6904.
34. Vinogradov, A., A. Scarpa (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 5527.
35. Mitchell, P. (1961) *Nature* 191, 144; (1967) *Fed. Proc.* 26, 1370.
36. Mitchell, P. (1975) *Bioch. Soc, Trans*; (1977) *Febs. Letters* 78, 1.

37. Jagendorf, A.T. y E.G. Uribe (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. 55, 1970.
38. Mitchell, P. y J. Moyle (1967) Biochem. J. 105, 1147.
39. Mitchell, P. y J. Moyle (1969) Europ. J. Biochem. 7, 471.
40. Grinius, L.L., A.A. Jasaitis, Y.P. Kodziauskas, E.A. Liberman, V.P. Skulachev, V.P. Topali, L.M. Tsofina y M.A. Vladimirova. (1970). Biochim. Biophys. Acta 216, 1
41. Bakeeva, L.E., L.L. Grinius, A.A., Jasaitis, V.V. Kuliene, D.O. Levistsky, E.A. Liberman, II. Severiva y V.P. Skulachev. (1970) Biochim. Biophys. Acta 216, 13
42. Mitchell, P. (1979) Europ. J. Biochem. 95, 1.
43. Selwyn, M.J., A.P. Dawson y S.J., Dunnett (1970) Febbs. Letters 10, 1.
44. Rottenberg, H. y A. Scarpa (1974) Biochem. 13, 4811.
45. Crompton, M. y I. Heid. (1978) Europ. J. Biochem. 91, 599.
46. De Roberis, E.D.P., F.A. Saez y E.M.F. de Robertis. Cell Biology, 6a. ed. Saunders 1º Philadelphia, (1975) p. 202.
47. Shelton, E., W.C. Schneider y N.J. Striebich. (1953) Exp. Cell. Res. 4, 32.
48. Reith, A., T. Bernard, y H.P. Rohr (1976) Critical Rev. Toxicol. 4, 219.
49. Fawcett, D.W. y N.S. McNutt (1969) J. Cell. Biol. 42, 1.
50. Jaguens, R. (1971). Cell. Biol. 48, 673.
51. Scarpa, A. y P. Graziotti (1973) J. Gen. Physiol. 62, 756.
52. Webb, J.L. (1950) Brit. J. Pharmacol. 5, 87.
53. Horn, R.S., C.E. Aronson, M.E. Hess y N. Hangaard (1967) Biochem. Pharmacol. 16 2109.
54. Horn, R.S., R. Levin y N. Hangaard (1969) Biochem. Pharmacol. 18, 503.
55. Patriarca, P. y E. Carafoli, (1968) J. Cell Physiol. 72, 29.
56. Carafoli, E., R. Tiozzo, G. Lausi, F. Crovetti y C. Kratzing (1974) J. Mol. Cell. Cardiol. 6, 361.

57. Haugaard, N., E.S. Haugard, N.H. Lee y R.S. Horn. (1969) Fed. Proc. 28 (1957)
58. Carafoli, E. y M. Crompton, (1978) Curr. Top. Memb. Trans. 10, 151.
59. Vercesi, A., B. Reynafarge y A.L. Lehninger (1978) J. Biol. Chem. 253, 6379.
60. Jacobus, W.E., R. Tiozzo, G. Lugli, A.L. Lehinger y E. Carafoli (1975) J. Biol. Che. 7863.
61. Crompton, M., M. Capano y E. Carafoli (1976) Europ. J. Biochem. 69, 453.
62. Crompton, M., M. Kunzi y E. Carafoli (1977) Europ. J. Biochem.
63. Crompton, M., E. Sigel y E. Carafoli (1979) en Fuction and Molecular Aspects of Biomembrane Transport (E. Quagliariello et al, eds.). Elsevier-North Holland.
64. Crompton, M., I. Heid, C. Baschera y E. Carafoli (1979) Febs Letters 104, 352.
65. Crompton, M. R. Moser, H. Luidi y E. Carafoli (1978) Europ. J. Biochem. 82, 25.
66. Mitchell, P. y J. Moyle (1969) Europ. J. Biochem. 9, 149.
67. Crompton, M. y I. Heid (1978) Europ. J. Biochem. 91, 599.
68. Crompton, M. I. Heid y E. Carafoli (1980) Febs. Letters 15, 257-
69. Gómez-Puyou, A., M. Tuena de Gómez-Puyou y L. Ernster (1979) Biochim. Biophys. Acta 547, 252.
70. Carafoli, E., M. Gavilanes, H. Affolter, M. Tuena de Gómez-Puyou y A. Gómez-Puyou (1980) Cell Calcium 1, 255.
71. Tuena de Gómez-Puyou, M., M. Gavilanes, A. Gómez-Puyou y Ernster, L (1980) Biochim. Biophys. Acta 592, 396.
72. Crompton et al Europ. J. Biochem. 69, 429 (1976)
73. Gómez-Puyou, A., M. Tuena de Gómez-Puyou, M. Klapp y E. Carafoli (1979) Arch. Biochem. Biophys. 194, 399.

74. Affolter, H., M. Chiesi, R. Dabrowska y E. Carafoli (1976)  
Europ. J. Biochem. 67, 389.
75. Carafoli, E. y M. Crompton (1978) Ann. N.Y. Acad. Sci.  
307, 269

GLOSARIO.

- Antimicina. Inhibidor respiratorio a nivel de sitio dos ( complejo citocromo b-citocromo c ). A elevadas concentraciones ( $> 5\mu\text{g}/\text{mg prot}$  ) es desacoplante.
- Antiport. Abreviación operacional de transportador o intercambiador bidireccional ( p. ej., el antiport Na/Ca intercambia calcio interno por sodio externo con una estequiometría de  $3\text{Na}/1\text{Ca}$  ).
- Atractilosido. Inhibidor competitivo de la adenin-nucleotido translocasa. Es impermeable y solo actua por el lado citosólico de la membrana interna mitocondrial.
- Aurovertina. Inhibidor de la actividad catalítica de la ATPasa (soluble y unida a membrana). Se une a la subunidad beta.
- Desacoplante. Sustancia lipofílica que, a través de equilibrar concentraciones de protones entre ambos lados de una membrana, estimula en mitocondria, la actividad de la cadena respiratoria ( transporte de electrones y expulsión de protones), pero no permite que se establezca un gradiente electroquímico, con lo cual puede inhibir la FO.
- DNP. 2,4-dinitrofenol. Desacoplante.
- FCCP. Carbonil-ciano-p-trifluorometoxifenilhidrazona, Desacoplante más activo que el DNP.
- FO. Fosforilación oxidativa. Es la síntesis de ATP que consume oxígeno. De acuerdo con la teoría quimiosmótica, la síntesis de ATP requiere de un gradiente electroquímico generado por la oxidación de sustrato a través de la cadena respiratoria y, por eso, la fosforilación de ADP es oxidativa.
- HOQNO. N-oxo-2-heptil-4-hidroxiquinoleina. Inhibidor respiratorio de sitio dos. No es desacoplante a elevadas concentraciones, como la antimicina.
- Ionoforo. Sustancia lipofílica que transporta iones y tiende a equilibrar sus gradientes electroquímicos entre ambos lados de una membrana semi-permeable.
- Nigericina. Ionoforo que intercambia  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$  a través de una membrana. La dirección de intercambio dependerá del gradiente químico de estos cationes.
- Oligomicina. Inhibidor de la actividad catalítica de la ATPasa unida a membrana, unicamente.
- Rotenona. Inhibidor respiratorio a nivel de sitio uno ( complejo NADH Deshidrogenasa-Ubiquinona ),
- SE Superestequiometría. Se explica en el texto.

- Sitio. Sitio de conservación de Energía . En la cadena respiratoria se han establecido tres complejos donde la energía liberada por las reacciones de oxido-reducción de las moléculas transportadoras de electrones (cuando es mayor de 7,3 kcal/mol ), se conserva en forma de ATP o es utilizada para transporte de iones.
- Uniport. Abreviación operacional de transportador o acarreador unidireccional ( p. ej., el uniport de calcio solo acumula calcio en el interior de la mitocondria, pero no lo expulsa ).
- Valinomicina Ionoforo específico para cationes monovalentes (  $K^+ > Na^+$  ),