

2
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSTGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

EFFECTO DEL CALCIO SOBRE ENZIMAS DE LA VIA DE FOSFORILACION OXIDATIVA EN MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA

T E S I S

Que para obtener el título de

Licenciada en Investigación Biomédica Básica

Presenta:

Norma Angélica Corona de la Peña

MEXICO, D. F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto del calcio sobre algunos de los complejos enzimáticos de la vía de fosforilación oxidativa, encontrándose que afecta principalmente la actividad acarreador de adenín nucleótidos y al complejo bc mitocondrial. El efecto del Ca^{2+} sobre el flujo de fosforilación oxidativa está mediado por dos mecanismos diferentes, uno involucra hinchamiento mitocondrial y actúa principalmente sobre la velocidad de respiración en el estado 4. El otro mecanismo es independiente del hinchamiento mitocondrial y afecta la velocidad de respiración en el estado 3. La presencia de K^+ en el medio es de gran importancia en el efecto del Ca^{2+} sobre la respiración. Por un lado, solo en presencia de K^+ el Ca^{2+} induce un hinchamiento mitocondrial y por otro, afecta la concentración intramitocondrial de Calcio en su forma libre.

INTRODUCCION

Dentro de las mitocondrias se lleva a cabo la fosforilación oxidativa, esta vía metabólica produce la mayor cantidad de energía de una célula y oxida la mayor cantidad de sustratos. Los sustratos parcialmente oxidados por otras vías metabólicas en el citoplasma, se oxidan totalmente por medio del proceso conocido como fosforilación oxidativa hasta CO_2 y H_2O , en una serie de reacciones que termina con la reducción del oxígeno molecular para formar H_2O y que produce una cantidad de energía 20 veces mayor que la producida en procesos anaeróbicos (36 de los 38 ATP que se producen al oxidar una molécula de glucosa hasta CO_2 y H_2O). Se compone de un sistema de transporte y deshidrogenación de sustratos, una cadena oxido-reductora formadora de un gradiente electroquímico de protones y un sistema fosforilante.

Por medio del gradiente electroquímico de protones se acoplan la cadena respiratoria y el sistema fosforilante, ya que este último utiliza la energía del gradiente electroquímico para sintetizar ATP (fig.1).

El control metabólico de la fosforilación oxidativa es de gran importancia en el establecimiento de un equilibrio entre la demanda y la producción de energía. Este debe permitir un aumento en la producción de ATP con el incremento en el trabajo celular e impedir que los sustratos sean oxidados extensivamente en condiciones en las que la célula no requiera de ello.

Se han propuesto varios mecanismos para la regulación de la fosforilación oxidativa. Entre ellos: el Ca^{2+} , que es el que nos ocupa en este trabajo, tiene la peculiaridad de ser una señal rápida y transitoria, cuya concentración puede ser aumentada por ciertos estímulos extracelulares y que entra a

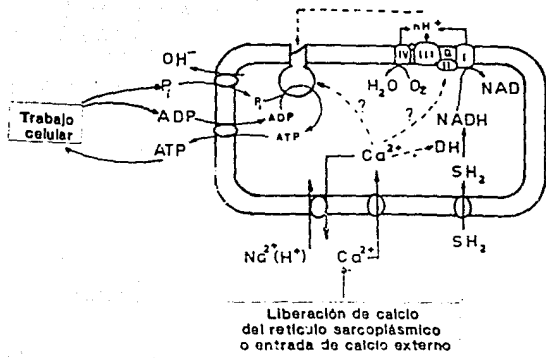


Fig. 1 Representación esquemática de la vía de fosforilación oxidativa dentro de la mitocondria. Ciertos sustratos producidos en el citoplasma, entran a la mitocondria a través de acarreadores específicos; al deshidrogenarse dentro de este organelo se producen equivalentes reductores que son oxidados dentro de la cadena oxido-reductora con lo que se establece un gradiente electroquímico de protones el cual es utilizado por la ATP sintasa para fosforilar ADP. Se esquematiza también el papel del Ca^{2+} en la regulación del flujo de esta vía (tomada de Moreno-Sánchez y Torres-Márquez, 1991).

la mitocondria aumentando la velocidad de producción de ATP en un corto intervalo de tiempo. Su actividad puede detectarse a concentraciones fisiológicas y es totalmente reversible, permitiendo la respuesta a nuevos estímulos .

El mecanismo de activación de la respiración debida al Ca^{2+} no se ha determinado todavía. Se propone, por un lado, que puede interactuar con algunos de los complejos de la cadena respiratoria, y por otro, que este efecto del Ca^{2+} es mediado por un hinchamiento mitocondrial.

Estructura mitocondrial:

Las mitocondrias ocupan una fracción importante del citoplasma de casi todas las células eucarióticas y fueron identificadas por primera vez en el siglo XIX (Altmann, 1890). En 1948 se desarrollo un procedimiento para aislarlas de manera intacta (Hogeboom y cols., 1948). La mayoría de los estudios bioquímicos hechos en mitocondrias han sido realizados en mitocondrias aisladas de hígado, ya que cada célula hepática contiene entre 1000 y 2000 mitocondrias, las cuales ocupan una quinta parte del volumen celular. Las mitocondrias suelen tener entre 0.5 y 1 μm de diámetro y formas diferentes según el tejido al que pertenezcan. Son capaces de desplazarse por el citoplasma asociadas al citoesqueleto, lo que probablemente contribuya a la distribución característica de este organelo dentro de una célula. Su actividad metabólica se acompaña de cambios morfológicos: hinchamiento y contracción (Lehninger y cols., 1958). En algunos tipos celulares, las mitocondrias forman largos filamentos móviles, mientras que en otros tienen una distribución más o menos fija. Están generalmente asociadas a sitios de consumo elevado de ATP, o a depósitos de sustratos.

La mitocondria está limitada por dos membranas altamente

especializadas que rodean a la matriz mitocondrial (Sttoca y cols. 1967) Entre estas dos membranas se forma el espacio intermembranal, donde se encuentran diversas enzimas que utilizan el ATP formado dentro de la mitocondria para fosforilar otros nucleótidos. La membrana externa mitocondrial contiene numerosas copias de una proteína: la porina, que forma grandes canales acuosos a través de la bicapa lipídica, permitiendo el paso hacia el interior de moléculas menores a 10000 daltons. Debido a la presencia de esta proteína, el contenido del espacio intermembranal es equivalente al del citoplasma.

La membrana interna mitocondrial está en estado semifluido, contiene un 70% de proteína, el 50% de la cual esta asociada al proceso de fosforilación oxidativa. Contiene un 30% de lípidos, principalmente fosfatidilcolina (40%), fosfatidiletanolamina (35%) y cardioplipina (15%). El alto contenido de cardioplipina confiere una gran impermeabilidad a la mayoría de los iones.

La membrana interna mitocondrial suele estar plegada formando crestas (Sjöstrand, 1953). Las crestas permiten que el área de esta membrana sea mayor: en mitocondrias de células hepáticas esta membrana es casi 5 veces más grande que la membrana externa y constituye la tercera parte del total membranal de la célula. El número de crestas parece estar relacionado con la demanda energética del tejido al que pertenezcan las mitocondrias, por ejemplo, las mitocondrias de células cardíacas tienen 3 veces más crestas que las de las células hepáticas.

Embebidos en la membrana interna mitocondrial se encuentran complejos proteicos de transporte, así como las enzimas de la cadena de oxido-reducción (Cleland y Slater, 1953). Dentro de la matriz mitocondrial se hallan las enzimas que metabolizan piruvato, ácidos grasos y las que forman parte

del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Kenned y Lehninger, 1949).

La matriz mitocondrial contiene también varias copias del genoma de ADN mitocondrial, así como ribosomas especiales: mitorribosomas, RNA de transferencia y enzimas necesarias para la expresión genética (Maclean y cols, 1958; Nass y Nass, 1963).

Transporte y deshidrogenación de sustratos:

El metabolismo oxidativo de las mitocondrias utiliza como combustibles mayoritarios tanto los ácidos grasos como el piruvato, este último es producido por la oxidación de los azúcares en la vía de la glicólisis. Otros sustratos, como el succinato, el glutamato y el alfa-cetoglutarato, provenientes de la oxidación citosólica de los aminoácidos también entran a la mitocondria para ser oxidados.

Estos sustratos son transportadas selectivamente desde el citosol hasta la matriz mitocondrial. El piruvato, el alfa-cetoglutarato y el succinato entran a la mitocondria a través de acarreadores proteicos específicos (LaNoue y Schooverth, 1979). El transporte de piruvato y probablemente el de glutamato utiliza la energía del gradiente electroquímico de protones. En el caso del succinato, el alfa-cetoglutarato y el glutamato, el transporte se da por medio de un intercambio con malato o con fosfato. El glutamato se transporta también en un intercambio por aspartato.

Los ácidos grasos, una vez transportados a la matriz mitocondrial por medio de la aciltransferasa, son oxidados mediante un ciclo de reacciones que elimina dos átomos de carbono de su extremo carboxilo. De esta manera se genera una

molécula de acetil CoA en cada vuelta de ciclo de la β -oxidación de los ácidos grasos. El piruvato es transformado dentro de la mitocondria en acetil CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa.

El grupo acetilo de la molécula de acetil CoA, producido por diversas reacciones, entra en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, donde es oxidado por deshidrogenasas dependientes de NAD.

En el caso del succinato, éste es oxidado por una deshidrogenasa dependiente de FAD. Esta enzima forma parte del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Se forman como productos del ciclo de los ácidos tricarbóxicos: CO_2 que es expulsado fuera de la mitocondria y coenzimas reducidas. Las coenzimas reducidas que se producen (NADH y FADH_2) son donadores de electrones de alta energía que entran a la cadena respiratoria.

Cadena de óxido-reducción y sistema fosforilante:

La cadena de óxido-reducción está compuesta por complejos enzimáticos que se encuentran parcialmente embebidos dentro de la membrana interna mitocondrial; estos complejos catalizan el transporte de electrones desde coenzimas reducidas hasta el último aceptor de electrones de la respiración: el oxígeno. Con la cadena respiratoria se consigue que la reacción $\text{H}_2 + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ se produzca en varios pasos, liberando la energía en pequeñas porciones. De esta manera, la mayor parte de la energía producida puede ser almacenada dentro del enlace fosfato del ATP, evitándose que sea liberada al medio en forma de calor.

Los complejos enzimáticos que forman parte de la cadena respiratoria han sido purificados con la ayuda de

detergentes iónicos relativamente suaves, identificándose 5 (Hatefi, 1985), designados según el orden en el que transfieren electrones entre uno y otro (fig. 2):

- I : NADH-ubiquinona oxidoreductasa
- II : Succinato-ubiquinona oxidoreductasa
- III: Ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa
- IV : Ferricitocromo c-oxidoreductasa
- V : ATP-sintasa

También forman parte de esta cadena la ubiquinona y el citocromo c, éstos se encuentran en concentraciones mayores a los complejos enzimáticos y tienen un coeficiente de difusión mucho mayor que estos últimos; por lo que se les atribuye un papel en la distribución energética dentro de la cadena (Hackenbrock y cols., 1986).

La transferencia de electrones entre los complejos respiratorios se lleva a cabo mediante grupos prostéticos de estructuras quinoides o complejos de metales de transición:

- FMN: Flavinmononucleótido
- FAD: Flavinadeníndinucleótido
- Q : Quinona
- Fe-S: complejos hierro-azufre
- H : grupos hemo
- Cu : cobre unido a proteína

Estos grupos transfieren electrones entre sí según su potencial redox, produciendo cambios casi idénticos de energía entre cada uno de los pasos de la cadena. Los cambios en el estado de reducción de estos grupos producen cambios en el espectro visible o UV. A través de los complejos I, III y IV se bombean protones hacia afuera de la mitocondria. Estos protones vuelven a entrar por la ATP sintasa en el proceso de síntesis de ATP (fig. 3).

El flujo de la cadena respiratoria puede ser seguido mediante el consumo de oxígeno mitocondrial. Utilizando

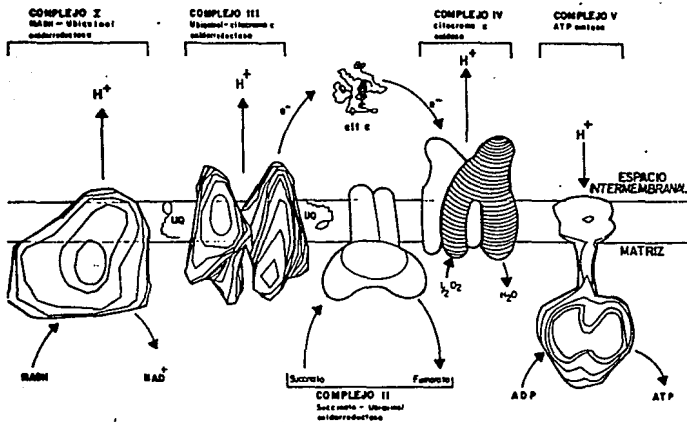


Fig. 2 Distribución de los complejos respiratorios dentro de la membrana interna mitocondrial. Se representa el transporte de electrones entre ellos, así como la translocación de protones a través de la membrana interna mitocondrial (tomada de González-Halphen, 1990).

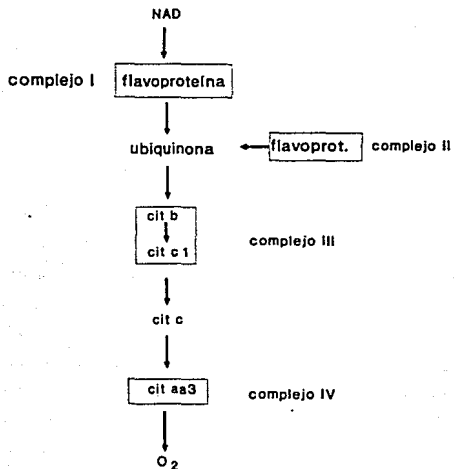


Fig. 3 Transferencia de electrones entre los grupos prostéticos de los complejos respiratorios, la ubiquinona y el citocromo c. Se encuadran los grupos pertenecientes a cada complejo.

sustratos e inhibidores específicos (algunos de ellos sintéticos), es posible evaluar la actividad de cada uno de los complejos que la componen (fig. 4).

En presencia de tetrametilfenilendiamina (TMPD), el ascorbato dona e⁻ para reducir al citocromo c. Los iones Fe(CN)₆³⁻ (ferricianuro) aceptan e⁻ del cit c. La oligomicina inhibe específicamente a la ATP sintasa y los desacoplantes, como el CCCP, abaten el potencial transmembranal.

Los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria parecen difundir como entidades independientes en el plano de la bicapa lipídica (Hackenbrock y cols, 1986) estimándose que difunden unos 40 nm por mseg (unas 6 veces su propio diámetro), la ubiquinona y el citocromo c tienen un coeficiente de difusión parecido al de los fosfolípidos 10⁻⁸ cm /seg⁻¹. El número de colisiones al azar calculadas son suficientes para permitir la transferencia de electrones a las velocidades observadas (cada complejo dona y recibe un electrón una vez cada 5-20 mseg). Por consiguiente, no es necesario que la cadena de electrones esté ordenada estructuralmente en la bicapa lipídica. Por cada molécula de NADH deshidrogenasa se estima que existen 3 moléculas de complejo bc₁, 7 moléculas de citocromo oxidasa 9 moléculas de citocromo c y 50 moléculas de ubiquinona (Hackenbrock y cols. 1986).

Las moléculas oxidadas dentro de la cadena respiratoria son moléculas donadoras de hidrógenos. La vía de fosforilación oxidativa implica la separación de éstos en protones y electrones, así como la generación de un potencial interno negativo a través de la membrana interna mitocondrial. Este potencial es generado por el bombeo de protones hacia el exterior de la mitocondria en algunos de los pasos de la

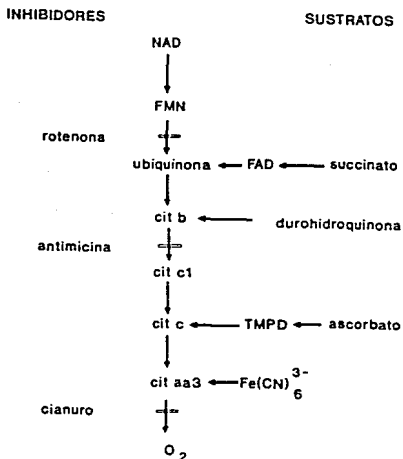


Fig. 4 Sustratos e inhibidores específicos del transporte de electrones entre los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. Se esquematiza el transporte de electrones entre los componentes de la cadena respiratoria, así como los sustratos que son capaces de donar electrones a cada uno de ellos y los inhibidores específicos para cada uno de los componentes de la cadena respiratoria.

cadena.

Con el bombeo de protones se genera un gradiente de pH a través de la membrana mitocondrial interna, con una diferencia de aproximadamente una unidad con respecto al pH citosólico que suele ser de 7. Se genera también un gradiente de voltaje negativo en el interior, que junto con el gradiente de pH constituyen el gradiente electroquímico de protones; éste tiende a impulsar a los iones H^+ de nuevo hacia adentro y a los iones OH^- hacia afuera.

La fuerza protomotriz producida es aproximadamente de 220 mV y el potencial transmembranal suele ser de 160 mV. Este gradiente electroquímico es la fuente de energía, tanto para el transporte de iones y sustratos a través de la membrana interna mitocondrial, como para la síntesis de ATP por la ATP sintasa (Mitchell, 1961).

La concentración de ATP dentro de una célula es 5-10 veces mayor que la de ADP, por tanto, la hidrólisis de ATP dentro de ella es extremadamente favorable (entre -11 y -13 kilocalorías por mol). La gran capacidad de formación de ATP que tiene la vía de fosforilación oxidativa contribuye a que esta concentración de ATP se mantenga elevada.

Control de la fosforilación oxidativa:

Para que exista un equilibrio entre la demanda y la producción de energía, la oxidación de sustratos hasta CO_2 y H_2O , así como la síntesis de ATP deben ser eficientemente regulados. En órganos poco aeróbicos, el ATP que necesita la célula es producido tanto por la glicólisis como por la fosforilación oxidativa; sin embargo, el metabolismo de los tejidos aeróbicos, como el corazón, el hígado y el riñón es dependiente en gran medida del ATP producido por la vía de fosforilación oxidativa, (Newsholme y Leech, 1983). Un

aumento en el trabajo celular de estos tejidos requiere de una gran cantidad de energía, la cual debe ser producida de una manera rápida y sin dejar al tejido en condiciones en las que una nueva demanda sea insuperable.

Existen varias maneras de regular la velocidad de flujo de la vía: Las concentraciones de sustratos, ADP, Pi, O₂ y cofactores son moduladores potenciales, ya que afectan directamente la actividad de las enzimas de la vía de fosforilación oxidativa. El potencial citosólico de fosforilación ejerce también control sobre la velocidad de síntesis de ATP, en este caso es un control termodinámico, en el que las concentraciones de ATP a uno y otro lado de la membrana interna mitocondrial afectan la relación ADP/ATP dentro de este organelo.

Existe la idea de que el gradiente electroquímico de protones puede tener un efecto inhibitorio sobre el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria (Sánchez y cols., 1988), ya que un desacoplante puede desinhibirla y aumentar su velocidad de flujo. Si el gradiente es grande, el transporte de electrones es más lento y puede parar e incluso ser inverso en algunos pasos de la vía, así, el gradiente afecta no solo la actividad de la ATP sintetasa, sino también la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria.

El control de la fosforilación oxidativa fue explicado originalmente en términos de la disponibilidad de ADP (Chance y Williams, 1956). En períodos de trabajo aumentado, cuando se incrementa la concentración de ADP citoplásmico, hay un aumento en el flujo total de la vía, porque el ADP es sustrato para el translocador ATP/ADP. Sin embargo, en experimentos con corazón perfundido se encontró que no hay una relación única entre la concentración citoplásmica de

ADP y el consumo de O_2 , sugiriendo que hay otros factores que afectan el flujo de la vía de fosforilación oxidativa (Mathews y cols., 1982).

De acuerdo a la teoría de control, (Kacser y Burns, 1979) en un estado estacionario, en el que las reacciones parciales alcanzan velocidades idénticas, las enzimas que catalizan reacciones lentas estarán lejos del equilibrio termodinámico, de esta manera limitarán el flujo total de la vía. Las que catalizan reacciones rápidas operarán lejos del equilibrio no limitando este flujo. Basándose en estudios con inhibidores específicos, se han descrito varios pasos limitantes para el flujo de la vía de fosforilación oxidativa, los más importantes son el acarreador de adenín nucleótidos, el complejo citocromo oxidasa y el acarreador de dicarboxilatos (Groen y cols., 1982), la contribución de cada paso varía de tejido a tejido y con la presencia de Ca^{2+} y P_i^- (Moreno-Sánchez, 1985a).

Control de la fosforilación oxidativa por Ca^{2+} :

Por último, se ha propuesto que el Ca^{2+} elevado es la señal para aumentar el flujo fosforilante (Sordahl, 1975; Malmström y Carafoli, 1977; Robertson y cols., 1982; Hillered y cols., 1983). El Ca^{2+} actúa como trasductor de señales de hormonas o depolarización eléctrica (Tsien, 1983).

Se ha establecido que el Ca^{2+} puede ser la señal para aumentar el flujo fosforilante por medio de la activación de deshidrogenasas sensibles a Ca^{2+} (Hansford, 1980, 1985; Denton y McCormack 1980, 1985), sin necesidad de bajar el potencial de fosforilación (ATP/ADP) y manteniendo la concentración de ATP citoplásmico en el rango en el que no limita el proceso de su consumo.

A concentraciones de Ca^{2+} (menores a $1 \mu\text{M}$), Pi^- , Na^{2+} , Mg^{2+} y pH fisiológicos, en condiciones no saturantes de sustrato (Hansford y Chappell, 1967), este ión aumenta la cantidad de piruvato deshidrogenasa en forma activa, al aumentar la actividad de la piruvato deshidrogenasa fosfatasa la cual defosforila (activando) a la piruvato deshidrogenasa (Hunghe y cols., 1981; Denton y cols., 1972; Pettit y cols., 1972). El Ca^{2+} aumenta la afinidad por su sustrato de la isocitrato deshidrogenasa (Denton y cols., 1987), de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (McCormack y Denton, 1979) y de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Hansford y Chappell, 1967).

Excepto por esta última, que se encuentra en la cara externa de la membrana mitocondrial interna, las demás miran hacia la matriz mitocondrial, por lo que es necesario que el Ca^{2+} entre a la mitocondria para activar a estas enzimas (Denton y McCormack, 1980).

El Ca^{2+} entra a la mitocondria utilizando la energía del gradiente electroquímico de protones, a través de un uniportador (Puskin y cols., 1976) electroforético inhibido específicamente por rojo de rutenio (Moore, 1971). En el citoplasma, la concentración es muy baja 10^{-7} molar, y en células excitadas aumenta a 10^{-5} molar (Akerman y Nicholls, 1983). Los sistemas de transporte $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{2+}$ y $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (en hígado y riñón predomina el antiportador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$) lo sacan rápidamente. Se constituye así un ciclo de entrada y salida de Ca^{2+} a través de la membrana mitocondrial interna (Akerman y Nicholls, 1983), que es de vital importancia para la actividad del Ca^{2+} como señal rápida y transitoria del control de la producción de ATP (fig.5).

El efecto del Ca^{2+} es modificado por Mg^{2+} , que inhibe competitivamente la entrada de Ca^{2+} , y por Na^+ que lo saca de la mitocondria. En ausencia de estos iones la $\text{K}_{0.5}$ para

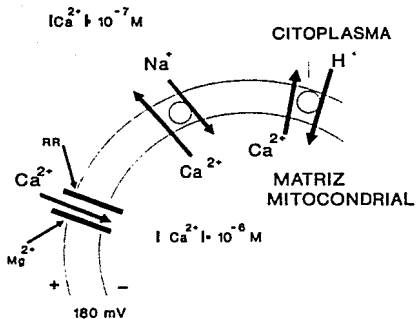


Fig. 5 Ciclo de entrada y salida de Ca^{2+} a través de la membrana interna mitocondrial. El Ca^{2+} entra a la mito por un uniportador electroforético y sale en un intercambio con Na^+ o con H^+ (tomada de Denton y McCormack 1980)

la estimulación de las deshidrogenasas mitocondriales por Ca^{2+} está entre 10-100 nM. Dentro de la célula la concentración de Mg^{2+} es de 1 mM y la de Na^+ de 10 mM, en esas condiciones la $K_{0.5}$ para la estimulación por Ca^{2+} es de 300-600 nM, así que en condiciones fisiológicas, la $K_{0.5}$ para la estimulación por Ca^{2+} está alrededor de 1 μM .

Se ha descrito un aumento en el trabajo celular asociado a aumentos en la concentración de Ca^{2+} citoplásmico en miocitos cardiacos aislados y permeabilizados con detergente (Fabiato, 1981), y en fibras musculares (Saida y Nomura 1978), así como en miocitos cardiacos permeabilizados y en hepatocitos (Reinhart y cols., 1984).

La piruvato deshidrogenasa es regulada también por inhibición por producto y por NADH/NAD^+ y acetyl CoA/CoA y fosforilación por cinasa dependiente de ATP (regulada también por ATP/ADP , sustrato y producto NAD) y fosfatasa (regulada también por Mg^{2+} y Ca^{2+}) (Denton y cols., 1971). Las deshidrogenasas de invertebrados no son estimuladas por Ca^{2+} (McCormack y Denton, 1981). La NAD-isocitrato deshidrogenasa y la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa también son reguladas por ADP/ATP y NAD/NADH (McCormack y Denton, 1980).

Se ha reportado un aumento en la cantidad de piruvato deshidrogenasa activa inducido por trabajo en corazón, hígado y otros órganos, pero no se han hecho los correspondientes ensayos de consumo de O_2 . Observaciones en corazón de perro in situ sugieren una relación entre el aumento de trabajo y la velocidad de consumo de O_2 asociada a una concentración de ADP constante, a concentraciones de sustrato y O_2 fisiológicas (Matthews y cols., 1982).

Relación entre el efecto del Ca^{2+} y la acción hormonal:

Ciertas hormonas, como el glucagon, la vasopresina y algunos agonistas alfa-1 adrenérgicos (fenilnefrina y epinefrina en presencia del agonista β propanolol), además de su efecto sobre la actividad secretora celular, síntesis proteica y contracción muscular, estimulan el consumo de O_2 y el metabolismo mitocondrial (Binet y Claret, 1983; Taylor y cols., 1983; Halestrap, 1983; Kraus-Friedman, 1986). El mecanismo común de estas enzimas es aumentar la concentración citosólica de Ca^{2+} (Altin y Bygrave, 1988). De los segundos mensajeros que se conocen, el Ca^{2+} es el único que puede entrar a la mitocondria. Estas hormonas estimulan también la gluconeogénesis y la ureogénesis (Titheradge y Haynes, 1980).

Otras hormonas aumentan la respiración por otros mecanismos, como es el caso de la insulina, que al entrar a las células grasas del epidídimo aumenta la cantidad de piruvato deshidrogenasa activa en 3-5 min (Denton y cols., 1971), tiene también este efecto en hígado (Assimacopoulos y cols., 1982), sin embargo, pudo demostrarse que el efecto de la insulina es independiente de los cambios en la concentración intramitocondrial de Ca^{2+} .

En corazón y en hígado el aumento en la concentración de Ca^{2+} producido por la acción hormonal aumenta la cantidad de piruvato deshidrogenasa en forma activa, ya que en mitocondrias preparadas rápidamente, después del tratamiento del tejido con adrenalina, vasopresina y glucagon + vasopresina (Assimacopoulos-Teannet y col, 1986), aumenta la cantidad de piruvato deshidrogenasa en forma activa (McCormack, 1985). Esta estimulación es inhibida por rojo de rutenio y sodio (lo cual es evitado con diltiazem), el efecto se reproduce en las mitocondrias control si se les agrega Ca^{2+} . Se ha descrito que en hepatocitos la fenilnefrina aumenta la respiración (Dehaye y cols., 1981)

y la proporción de piruvato deshidrogenasa en forma activa (Staddon y Hansford, 1989), la epinefrina aumenta la carboxilación de piruvato (Garrison y Haynes, 1975) y la respiración (Binet y Claret, 1983); la vasopresina aumenta la respiración (Dehaye y cols., 1981) y la cantidad de piruvato deshidrogenasa activa (Oviasu y Whitton, 1984). Por su parte, el glucagon aumenta la carboxilación de piruvato (Thitheradge y Hynes, 1980), y la proporción de piruvato deshidrogenasa en forma activa (Staddon y Hansford, 1989).

Efecto del Ca^{2+} sobre la cadena respiratoria y el sistema fosforilante:

Existe evidencia de que el Ca^{2+} puede afectar la actividad de otras enzimas además de las deshidrogenasas mitocondriales.

El Ca^{2+} puede estimular el flujo de la vía de fosforilación oxidativa en presencia de succinato y rotenona, o NADH a concentraciones saturantes (Doussiere y cols., 1984). Esto sugiere que este ión ejerce control sobre otros pasos de la vía, posteriores a la deshidrogenación de sustratos.

Se ha descrito que el Ca^{2+} puede activar directamente a la cadena respiratoria (Jacobus y cols., 1982) y al sistema fosforilante en el acarreador ATP/ADP (Foldes y Barrit, 1977). También ha sido descrito un efecto del Ca^{2+} sobre el complejo bcl mitocondrial (Murphy y cols., 1990). El efecto del Ca^{2+} depende del medio de incubación, de la temperatura y del tiempo de incubación.

Las concentraciones de Ca^{2+} a las cuales se logra una estimulación máxima del flujo de la vía en este sistema están en el rango de 0.5-1 μM , y son modificadas por los iones Mg^{2+} y Pi^- , tanto en mitocondrias de hígado como en

mitocondrias de corazón (Moreno-Sánchez R., 1985a).

Se ha descrito que el Ca^{2+} aumenta el tiempo de activación de la NADH ubiquinona reductasa (K_{Ca} 5.7-6 mM) (Kotlyat y cols., 1992) y que incrementa el transporte y la carboxilación de piruvato (entre 10 y 100 μM de Ca^{2+}) (Foldes y Barrit, 1977), sin embargo, esto parece no tener significado fisiológico, ya que las concentraciones de Ca^{2+} a las que puede detectarse son extremadamente altas.

Mecanismos de activación de la respiración por Ca^{2+} :

Como se ha mencionado, el Ca^{2+} puede afectar directamente la actividad de algunas de las enzimas de la vía de fosforilación oxidativa, pero existen otros mecanismos por medio de los cuales podría explicarse el efecto del Ca^{2+} sobre el flujo de esta vía:

Se sabe que la entrada de Ca^{2+} utiliza la energía del gradiente electroquímico de protones y por tanto compite con el sistema fosforilante por la utilización de esta fuente de energía. En estudios de competencia se ha observado que la mitocondria puede llegar a transportar Ca^{2+} preferentemente, en vez de fosforilar ADP, calculándose que entran 2 iones Ca^{2+} por par de electrones que se transporta a través de la cadena respiratoria (Vercesi y cols., 1978).

El efecto del Ca^{2+} sobre la velocidad de consumo de oxígeno es similar al que produce el ADP, aumentando la velocidad y luego regresando a la velocidad inicial. Esto puede observarse también alternando adiciones de ADP y Ca^{2+} . Cuando se agregan juntos, el transporte de Ca^{2+} predomina sobre la fosforilación de ADP transportándose hasta 800 ng de Ca^{2+} por mg de proteína mitocondrial.

A altas concentraciones (2-4 mM), el Ca^{2+} desacopla

completamente a las mitocondrias, con lo que la velocidad de respiración se ve incrementada (Vasington y Murphy, 1962). En estas condiciones se estimula la formación de ácidos grasos libres (Wojtczak y Lehninger, 1961) y se produce un hinchamiento mitocondrial (Lehninger, 1962).

Algunos estudios sugieren que el mecanismo por el cual el Ca^{2+} estimula el flujo a través de la cadena respiratoria tiene que ver con cambios de volumen de la matriz mitocondrial inducidos por la entrada de K^+ (Halestrap, 1989).

Como se ha mencionado, ciertas hormonas que aumentan la concentración citosólica de Ca^{2+} en el hígado estimulan la respiración. El aumento en la concentración de Ca^{2+} produce un aumento del 20-40 % en el volumen mitocondrial (Quinlan y Halestrap, 1986) y se sugiere que este hinchamiento es el responsable de la activación en la respiración. Esta idea es apoyada por el hecho de que otros efectos de dichas hormonas, como el aumento en la carboxilación del piruvato, la oxidación de ácidos grasos, la síntesis de citrulina, y la activación de la glutaminasa pueden ser reproducidos al inducir hinchamiento mitocondrial (McCormack y cols., 1990).

Todas estas enzimas sensibles al aumento en el volumen mitocondrial se encuentran embebidas en la membrana, o pueden interaccionar con ésta (Hampson y cols., 1983). Debido a esto, se ha sugerido que el efecto del hinchamiento tiene que ver con un cambio en la conformación de las enzimas al alterarse la estructura de los fosfolípidos que la rodean, sin embargo, no hay evidencia directa de esto.

En el caso de la respiración, un aumento en el volumen mitocondrial podría estar relacionado con un aumento en la fluidez de membrana, lo que incrementaría la movilidad tanto de las quinonas y del citocromo c, como de los complejos

respiratorios dentro de ella. Otra posibilidad es que con el hinchamiento aumente la permeabilidad de la membrana a los sustratos.

El aumento de volumen inducido por Ca^{2+} implica un aumento en la entrada de K^+ a la mitocondria (Halestrap y cols., 1986), que está mediado por una interacción entre el translocador de adenín nucleótidos y el PPI intramitocondrial (Davidson y Halestrap, 1988).

El Ca^{2+} causa un incremento en la concentración intramitocondrial de pirofosfato inhibiendo a la pirofosfatasa que se encuentra en la matriz (Davidson y Halestrap, 1988), ya que forma un complejo Ca^{2+} -PPI y este inhibe competitivamente a la enzima (cuyo sustrato es el complejo Mg^{2+} -PPI), sin embargo, la fuente de PPI no se ha determinado. La degradación de fosfolípidos de la membrana puede producir PPI, pero se ha comprobado que la cantidad de PPI producido por este mecanismo resulta insuficiente para producir el efecto activador del Ca^{2+} , ya que al inhibir la actividad de la fosfolipasa A no se produce disminución de la actividad del Ca^{2+} (Davidson y Halestrap, 1987).

Se ha propuesto que la interacción del PPI con el translocador de adenín nucleótidos (Krämer, 1985) abre canales de K^+ normalmente bloqueados por ATP o ADP, al ocupar este ión el lugar de los nucleótidos en la enzima (Halestrap y Davidson 1990).

Por último, el efecto del hinchamiento sobre la respiración no puede ser atribuido a la formación de poros inespecíficos en la membrana interna mitocondrial (formados al exponer las mitocondrias a grandes concentraciones de Ca^{2+}), ya que sustancias que bloquean estos poros, no disminuyen el hinchamiento producido por concentraciones menores a $3 \mu\text{M}$ de

Ca^{2+} (Davidson y Halestrap, 1990).

Papel del K^+ -en la fosforilación oxidativa:

Se sabe que el volumen mitocondrial está regulado por el balance entre la entrada electrogénica de K^+ a la matriz y la salida de este ión a través del antiportador K^+/H^+ (Halestrap, 1989).

La actividad del translocador K^+/H^+ está latente y se mantiene baja en condiciones fisiológicas (Bernardi y Azzone, 1983). Puede estar regulada por Mg^{2+} , el cuál se une reversiblemente a la proteína impidiendo que se transporte K^+ ; este mecanismo se propone para explicar la regulación del volumen mitocondrial con un mínimo gasto de energía. Esta idea es apoyada por el hecho de que en presencia de un desacoplante, estas mitocondrias carentes de K^+ tienden a hincharse (Duszynski y Wojtkczak, 1977). La salida de K^+ es sensible a desacoplantes y dependiente de energía (Bernardi y Azzone, 1983) y se incrementa a pH alto y en medios hipotónicos.

El translocador de adenín nucleótidos se ha propuesto como sitio de regulación de la permeabilidad mitocondrial al H^+ y al K^+ . Se ha observado que mitocondrias desacopladas del tejido adiposo muestran controles respiratorios con la adición de ADP o ATP (Nicholls, 1974) y se asumió que era porque estos nucleótidos disminuían la permeabilidad de la membrana mitocondrial a los iones (aumentada por una proteína desacoplante presente en estas mitocondrias) (Nicholls, 1977).

De esta manera, el potencial electroquímico de protones es regulado por la acción de nucleótidos, y se propone que este mecanismo existe en las mitocondrias de otros tejidos evitando la desenergización de estos organelos. El efecto

del ATP y el ADP sobre el potencial transmembranal es bloqueado por inhibidores del translocador de adenín nucleótidos (Panov y cols., 1980), lo que sugiere que es el mismo translocador de adenín nucleótidos el que transporta K^+ y H^+ , operando como poro que abre y cierra en respuesta a la presencia de nucleótidos.

Aparentemente, el K^+ está involucrado en el mecanismo de acoplamiento mitocondrial (Gómez-Puyou y cols., 1970), en presencia de sustratos dependientes de NAD, este acoplamiento puede recuperarse si se agrega K^+ en el estado 4, pero no si se agrega durante el estado 3. Este efecto del potasio es independiente de un aumento en el transporte de sustratos. El K^+ también puede jugar un papel importante en el transporte de adenín nucleótidos, ya que contribuiría a equilibrar las cargas del ADP^{3-} y del ATP^{4-} (Chávez, 1973).

Por otro lado, se ha propuesto que el K^+ puede modificar el efecto activador del Ca^{2+} sobre la fosforilación oxidativa limitando la concentración de este ión en forma libre dentro de la mitocondria (Chávez y cols., 1991).

Objetivo:

En este trabajo se persiguen 3 objetivos principales:

-Definir cuál de los complejos enzimáticos de la vía de fosforilación oxidativa es afectado por el Ca^{2+} , que sea responsable del efecto de este ión sobre el consumo de oxígeno mitocondrial.

-Evaluar la relación que existe entre el efecto del Ca^{2+} y la inducción de hinchamiento mitocondrial.

-Definir cual es el papel que desempeña el K^+ en la

activación por Ca^{2+} .

Metodología

Aislamiento de mitocondrias: Ratas Wistar hembras de 200 a 300 g, ayunadas por 24 horas se sacrifican por golpe y dislocación cervical, el hígado se extrae y se homogeneiza en un medio que contiene sacarosa 250 mM, Hepes 5 mM y EGTA 0.5 mM (medio SHE) a pH 7.4 y 4°C. Se centrifuga 10 min. a 1000 X g a 4°C. El sobrenadante se centrifuga 10 min. a 7000 X g a 4°C y el botón se resuspende con dedo frío. Este botón se incuba 5 min. con 250 µl de albúmina bovina delipidada al 5 % y 25 µl de ADP 0.2 M, se diluye con SHE 0.5 % albúmina y se centrifuga 10 min. a 7000 X g a 4°C. El botón se resuspende con dedo frío.

Partículas submitocondriales: Aproximadamente 400 mg de proteína mitocondrial se diluyen con SHE, MgCl₂ 15 mM y ATP 1mM hasta obtener una concentración de 20 mg/ml, se sonica 2 veces durante 10 segundos a 4°C y se centrifuga 10 min. a 7000 X g a 4°C. El sobrenadante se centrifuga 45 min. a 100000 X g a 4°C y el botón se resuspende con dedo frío.

Amortiguadores Ca²⁺/EGTA: Para mantener las concentraciones extramitocondriales de Ca²⁺ se utilizan amortiguadores Ca²⁺/EGTA como los descritos por Fabiato (Fabiato, 1988).

Consumo de oxígeno: Se mide con la ayuda de un electrodo del tipo YSI Clark. A menos que otra cosa se indique, se preincuban las mitocondrias (1 mg/ml) durante 7 min., a 34°C en un medio que contiene KCl 120 mM, MOPS 25 mM y EGTA 0.5 mM (medio KME) a pH 7.2, o en el medio SHE, en ambos casos en presencia de K₂HPO₄ 5.2 mM, succinato 5 mM y rotenona 1 µM. Después de la preincubación se agrega 0.4 mM de ADP. Se calculó una concentración de O₂ de 760 nmol/ml.

Actividad de citocromo oxidasa: Se mide por consumo de oxígeno sensible a azida de sodio. Las mitocondrias (1 mg/ml) se incuban en el medio KME a 34°C y en presencia de

ascorbato 7 mM, citocromo c de caballo 5 μ M y antimicina 0.5 μ M. Después de dos minutos se agrega 1 mM de TMPD. Los valores obtenidos se corrigieron contra el consumo de oxígeno en presencia de 1 mM de azida de sodio.

Actividad del complejo bcl mitocondrial: Se mide por consumo de oxígeno sensible a antimicina. Las mitocondrias (1 mg/ml) se preincubaban en el medio KME a 34°C y en presencia de K_2HPO_4 5.2 mM, rotenona 1 μ M y durohidroquinona 1 mM. Después de 7 min. de preincubación se agrega 0.4 mM de ADP. Los valores obtenidos se corrigieron contra el consumo de oxígeno en presencia de 1 mM de antimicina.

Actividad de hidrólisis de ATP: Se mide por disminución de absorbancia a 340 nm. Las mitocondrias (1 mg/ml) se incuban en el medio KME, y en presencia de fosfoenol piruvato 5.5 mM, NADH 5.5 mM, 5 μ l de piruvato cinasa (2 U/ml) diluida 1:4 y 5 μ l de lactato deshidrogenasa diluida 1:4. Después de dos minutos se agrega 4 mM de ATP.

Hinchamiento mitocondrial: Se mide por disminución de absorbancia a 540 nm en las condiciones y el medio indicados en cada caso.

Arseñilación oxidativa: Se mide por consumo de oxígeno estimulado por arsenato inorgánico. Las mitocondrias (1 mg/ml) se incuban en el medio KME y en presencia de rotenona 1 μ l, succinato 5 mM, glucosa 12.5 mM y 10 μ l de hexoquinasa (2 U/ml) diluida 1:4. Después de 7 minutos de preincubación se agrega 0.4 mM de ADP y/o 2 mM de arsenato inorgánico.

Mitocondrias carentes de K^+ : De acuerdo con el método descrito por Gómez-Puyou (1969), las mitocondrias (10 mg/ml) fueron incubadas 15 min. a 25°C en un medio que contiene sacarosa 100 mM, NaCl 75 mM, H_3PO_4 10 mM, glutamato 10 mM y EDTA 10 mM a pH 7.3. Se lavan después dos veces en el medio

SHE y se recuperan centrifugando 10 min. a 7000 X g y 4°C.

Actividad de piruvato deshidrogenasa: Se registra la producción de NADH a 340-370 nm con un espectrofotómetro de doble haz. Las mitocondrias (1 mg/ml) se incuban en el medio SHE en presencia de las concentraciones indicadas de Ca^{2+} . Después de 2 min. se agrega 0.5 mM de piruvato y se registra la producción de NADH.

Contenido intramitocondrial de Ca^{2+} : De acuerdo al método descrito por Saavedra-Molina y cols., (1990), las mitocondrias (25 mg/ml) se incuban 20 min. en el medio SHE en presencia de fluo-3/AM 10 μM y ácido plurónico 0.03 % con agitación suave. Después se centrifugan 7 min. en una microcentrífuga Eppendorf, se diluyen con SHE y se vuelven a centrifugar, se lavan dos veces de esta manera. La fluorescencia de las suspensiones se mide con un fluorómetro Perkin Elmer MPF-44 con una longitud de onda de excitación de 526 nm (paso de banda de 10 nm) y emisión de 506 nm (paso de banda de 10 nm). Al final de cada experimento se mide la fluorescencia mínima (Fmin) agregando EGTA 600 μM y ionomicina 10 μM y la fluorescencia máxima (Fmax) agregando Ca^{2+} 6 mM. La concentración intramitocondrial de Ca^{2+} se calcula usando una Kd para fluo-3 de 400 μM y la fórmula: $[\text{Ca}^{2+}] = \text{Kd} (F - \text{Fmin}) / (\text{Fmax} - F)$ donde F es el valor de fluorescencia del problema.

Contenido intramitocondrial de K^+ : Siguiendo el método descrito por Gómez-Puyou y cols., (1969) se hicieron extractos ácidos de las suspensiones mitocondriales hirviéndolas 45 min. con HCl 80% (100 $\mu\text{l}/\text{mg}$) y agua (5 ml de volumen final), se centrifugaron 10 min. a 1000 X g y se midió la concentración de K^+ del sobrenadante flamométricamente.

Determinación de proteína: La concentración de proteína de

las suspensiones mitocondriales se determinó con el método de Biuret (Gornal y cols., 1949) después de solubilizar las muestras con desoxicolato de sodio. Se utilizó como referencia una solución 10 mg/ml de BSA.

Resultados

Integridad de la preparación mitocondrial:

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del Ca^{2+} en condiciones similares a las fisiológicas, por eso es importante que las mitocondrias sean aisladas intactas. Utilizando succinato como sustrato, en presencia de rotenona, las mitocondrias aisladas respiran a una velocidad de 100 ± 10 (4) nmol O/min mg en presencia de 0.4 mM de ADP y de 20 nmol O/ min mg en ausencia de ADP. Por lo tanto tienen un control respiratorio de 5.1 ± 0.1 (4) (*fig.6*) y una relación ADP/O de 3.0 ± 0.5 (4). Esto indica que las proteínas que intervienen en el proceso de Fosforilación Oxidativa, así como la membrana mitocondrial interna no han sido dañadas durante el proceso de aislamiento.

Efecto del Ca^{2+} sobre el consumo de Oxígeno:

Se utilizó una concentración de Ca^{2+} en el rango fisiológico (371 nM), y dentro del intervalo de concentraciones a las cuales este ión produce estimulación de la respiración (Moreno-Sánchez, 1985a). Se evaluó el efecto del Ca^{2+} sobre el consumo de oxígeno en presencia de succinato y rotenona, de manera que el efecto que se observó fué debido únicamente a la influencia del Ca^{2+} sobre enzimas de la cadena respiratoria. El Ca^{2+} estimuló tanto la respiración en estado 4 (en ausencia de ADP) como en estado 3 (en presencia de ADP), esta estimulación fué similar para ambos estados. Este efecto no fué debido a un desacoplamiento mitocondrial ya que los valores de control respiratorio y de la relación ADP/O permanecieron invariables en presencia del Ca^{2+} .

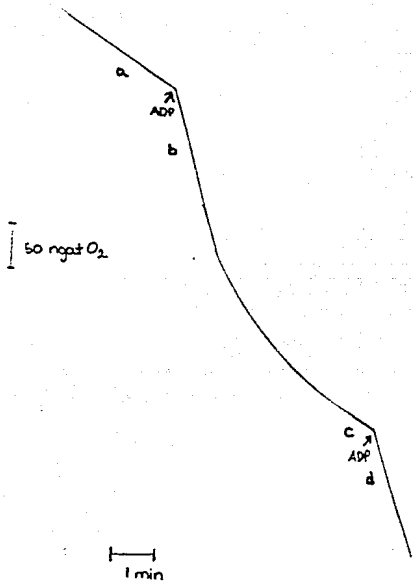


Fig. 6 Consumo de oxígeno mitocondrial. Las mitocondrias (1 mg/ml) se incuban en el medio KME (KCl 120 mM, MOPS 25 mM y EGTA 0.5 mM pH 7.2), a 34°C en presencia de K₂HPO₄ 5.2 mM, succinato 5 mM y rotenona 1 μM (a). Después de 7 min. de preincubación se agregó 0.4 mM de ADP con lo que se incrementa la velocidad de respiración (b), regresando después a la velocidad inicial (c). Una nueva adición de ADP aumenta de nuevo la velocidad de consumo de oxígeno (d).

Se evaluó el efecto del Ca^{2+} incubando las mitocondrias en dos medios diferentes: SHE y KME (descritos en la metodología) y se observó que esta estimulación es significativamente mayor en el medio suplementado con KCl como soporte osmótico que en el suplementado con sacarosa. Estos ensayos se hicieron a dos temperaturas diferentes y de acuerdo con datos ya reportados (Moreno-Sánchez, 1985a), la estimulación a 34°C fue mayor que a 30°C (tabla 1). El efecto del cambio de soporte osmótico se reprodujo a las dos temperaturas ensayadas.

Como ha sido reportado anteriormente (Moreno-Sánchez, 1985a), el efecto del Ca^{2+} es dependiente del tiempo de preincubación, obteniéndose una estimulación considerable después de 7 min (fig. 7), por lo tanto, nuestros ensayos fueron hechos con este intervalo de tiempo antes de añadir el ADP.

Efecto del Ca^{2+} sobre la actividad de citocromo oxidasa:

Con el fin de determinar que complejo enzimático es activado por Ca^{2+} y responsable del aumento en la velocidad de respiración, se evaluó el efecto de este ión sobre algunas enzimas respiratorias.

La actividad de la enzima citocromo oxidasa no fue afectada por la presencia de Ca^{2+} (tabla 2). Se hicieron ensayos a distintas osmolaridades y tampoco se vio alterada esta actividad.

Efecto del Ca^{2+} sobre la actividad del complejo bcl mitocondrial:

Utilizando durohidroquinona como sustrato (que cede electrones directamente al complejo bcl mitocondrial), el

Tabla 1 Efecto del Ca^{2+} (371 nM) sobre la respiración en el estado 3, con respecto a la temperatura y el medio de preincubación.

Medio	Temperatura	Porcentaje de activación
SHE	30°C	36 ± 2 (4)
SHE	34°C	47 ± 14 (4)
KME	30°C	82 ± 7 (4)
KME	34°C	112 ± 18 (4)

Las mitocondrias se incubaron en el medio KME (KCl 120 mM MOPS 25 mM EGTA 0.5 mM pH 7.5) o en el medio SHE (sacarosa 350 mM, HEPES 5 mM y 0.5 mM de EGTA) a 34°C en presencia de K_2HPO_4 5.2 mM, succinato 5 mM y rotenona 1 μM y con o sin Ca^{2+} (371 nM). Después de 7 min de preincubación se agregó 0.4 mM de ADP. Los valores representan $\bar{X} \pm \text{E.S.}$ (n).

Tabla 2 Efecto del Ca^{2+} (371 nM) sobre la actividad de citocromo oxidasa en medios con diferentes osmolaridades.

el medio	mM KCl en	Ca^{2+}	ngat O_2 /min mg
	20	-	467.46 ± 93.78 (5)
	20	+	383.38 ± 88.17 (5)
	120	-	454.08 ± 102.83 (5)
	120	+	439.23 ± 69.84 (5)
	200	-	383.66 ± 92.32 (5)
	200	+	334.80 ± 141.48 (5)

Las mitocondrias (1 mg/ml) fueron incubadas en el medio KME (KCl 120 mM, MOPS 25 mM y EGTA 0.5 mM pH 7.2) a 34°C en presencia de ascorbato 7 mM, cit. c de caballo 5 μM y antimicina 0.5 μM . Después de 2 min de preincubación se agregó 1 mM de TMPD y se registró el consumo de oxígeno. Los valores representan $\bar{X} \pm \text{E.S.}$ (n).

ngat O₂ /min mg

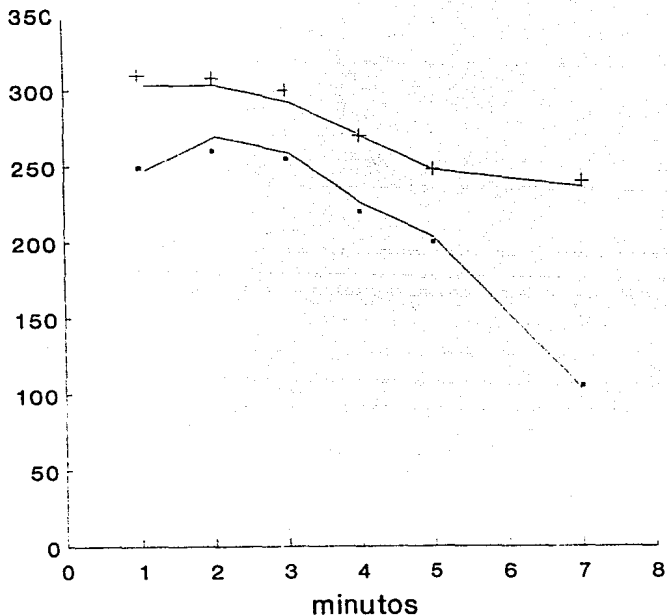


Fig. 7 Efecto del tiempo de preincubación sobre la velocidad de respiración en el estado 3. Las mitocondrias (1 mg/ml) se incubaron en el medio KME (KCl 120 mM, MOPS 25 mM y EGTA 0.5 mM pH 7.2) a 34°C, en presencia de K₂HPO₄ 5.2 mM, succinato 5 mM y rotenona 1 µM en presencia (371 nM) (+) o ausencia (.) de Ca²⁺. Después del tiempo de preincubación (1 a 7 min.) se agregó 0.4 mM de ADP. Los valores representan el consumo de oxígeno de experimentos representativos.

consumo de oxígeno fue estimulado por Ca^{2+} , de manera diferente en medios con distintas osmolaridades (fig. 8). El Ca^{2+} en estas condiciones produjo una activación de la respiración similar a la producida por ADP, dicha activación no es aumentada por la presencia del nucleótido, además de que los controles respiratorios en estos ensayos no fueron muy claros, porque en presencia de Ca^{2+} el ADP no estimuló aún mas el consumo de oxígeno y una segunda adición de este nucleótido ya sea en presencia o en ausencia de Ca^{2+} tampoco aumentó esta velocidad.

Efecto del Ca^{2+} sobre la actividad del translocador ATP/ADP:

Para evaluar la actividad del translocador de adenín nucleótidos se utilizó el sistema de arsenilación oxidativa. En este ensayo el consumo de oxígeno es estimulado por la adición de arsenato inorgánico (Ars), el arsenato entra a la mitocondria a través del acarreador de fosfato sensible a mersalil, arsenila al ADP interno para formar ADP-Ars en una reacción catalizada por la ATP sintasa, utilizando el gradiente electroquímico de protones generado por la cadena respiratoria.

El complejo ADP-Ars es hidrolizado rápidamente, produciéndose un ciclo de síntesis-hidrólisis en el que el translocador de adenín nucleótidos no participa. Si se agrega ADP, entonces la actividad del translocador de adenín nucleótidos sí participa en la estimulación del consumo de oxígeno. Se utilizó este principio para evaluar el efecto del Ca^{2+} sobre la actividad del translocador de adenín nucleótidos.

Se encontró que el Ca^{2+} produce un aumento del consumo de oxígeno en este sistema, pero solo en presencia de ADP (fig. 9). Esto indica que el Ca^{2+} efectivamente afecta la actividad del translocador de adenín nucleótidos.

ngat O₂ /min mg

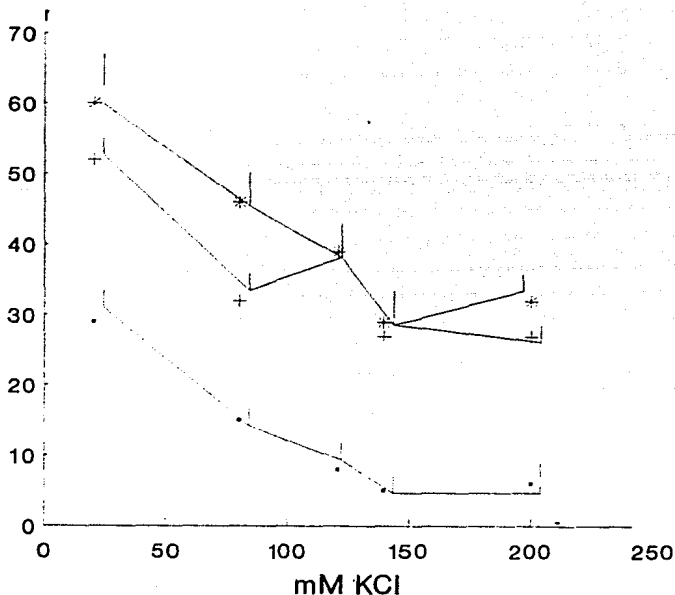


Fig. 8 Efecto del Ca²⁺ sobre la actividad del complejo bcl mitocondrial. Las mitocondrias (1 mg/ml) se incubaron en el medio KME (KCl 120 mM, MOPS 25 mM y EGTA 0.5 mM pH 7.2) a 34°C en presencia de K₂HPO₄ 5.2 mM, rotenona 1 μM y durohidroquinona 1 mM, en presencia (371 nM) (°) o en ausencia (+) de Ca²⁺. Después de 7 min. de preincubación se agregó 0.4 mM de ADP. Tanto a las mitocondrias incubadas en presencia (*) como a las incubadas en ausencia (+) de Ca²⁺. Los valores representan X ± E.S.(3).

ngat O₂ /min mg

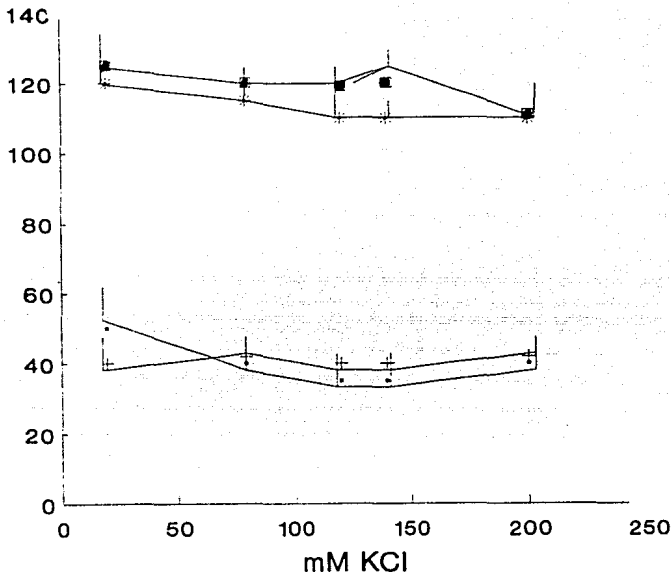


Fig. 9 Efecto del Ca²⁺ sobre la actividad del translocador de adenín nucleótidos en ausencia de ADP. Las mitocondrias (1 mg/ml) se incuban en el medio KME (KCl 120 mM, MOPS 25 mM y EGTA 0.5 mM pH 7.2) a 34°C, en presencia de succinato 5 mM, rotenona 1 μM, glucosa 12.5 mM y 10 μl de hexoquinasa (2 U/ml) diluida 1:4. En presencia (371 nM) (+) o en ausencia (·) de Ca²⁺. Después de 7 min de preincubación, se agregó 2 mM de arsenato inorgánico. Tanto a las mitocondrias incubadas en presencia (■) como a las incubadas en ausencia (*) de Ca²⁺. Los valores representan X ± E.S. (3).

Los cambios en la osmolaridad del medio no afectan la actividad del translocador, pero al parecer, el efecto del Ca^{2+} es mayor en medios hipotónicos que en medios hipertónicos (fig. 9 y 10).

Efecto del Ca^{2+} sobre la actividad de hidrólisis de ATP:

Con objeto de evaluar el efecto del Ca^{2+} sobre la ATP sintetasa, se midió la hidrólisis del ATP en partículas submitocondriales, evitando de esta manera la participación del translocador de adenín nucleótidos. No se encontró ningún efecto del Ca^{2+} sobre dicha actividad (tabla 3). El ensayo se repitió utilizando medios con distintas osmolaridades y tampoco se encontraron diferencias en la actividad de hidrólisis.

Mecanismos de activación del Ca^{2+} y participación del K^+ :

Efecto de la osmolaridad sobre la velocidad de respiración:

Algunos autores han propuesto que el efecto activador del Ca^{2+} es debido a que induce hinchamiento mitocondrial (Halestrap, 1989). Considerando lo anterior, se registró el consumo de oxígeno de la preparación mitocondrial a distintas osmolaridades con el fin de producir hinchamiento y contracción en los organelos. Observamos que tanto en el estado 3 como en el estado 4, el consumo de oxígeno se ve aumentado en medios hipotónicos y reducido en medios hipertónicos, sin embargo, el efecto del Ca^{2+} se presentó a todas las osmolaridades ensayadas (fig. 11 y 12). Esto indica que el efecto del catión es debido a un mecanismo independiente del hinchamiento mitocondrial.

Dependencia del efecto del Ca^{2+} en la presencia de K^+ en el medio:

Tabla 3 Efecto del Ca^{2+} (371 nM) sobre la hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales.

mM KCl	Ca^{2+}	nmol ATP/min mg
20	-	247.9 ± 31.59 (3)
20	+	231.36 ± 33.16 (3)
120	-	237.88 ± 68.82 (3)
120	+	203.14 ± 44.19 (3)
200	-	202.52 ± 53.92 (3)
200	+	153.59 ± 35.66 (3)

Las partículas submitocondriales (1 mg/ml) fueron incubadas en el medio KME (KCl 120 mM, MOPS 25 mM y EGTA 0.5 mM pH 7.4) a 34°C en presencia de fosfoenolpiruvato 5.5 mM, NADH 5.5 mM 5 µl de piruvato cinasa (2 U/ml) diluida 1:4 y 5 µl de lactato deshidrogenasa (2 U/ml) diluida 1:4. Después de dos minutos de preincubación se agrega 4 mM de ATP. Los valores representan $\bar{X} \pm \text{E.S. (n)}$. Esta actividad de hidrólisis se mide como se describe en la metodología.

ngat O₂ /min mg

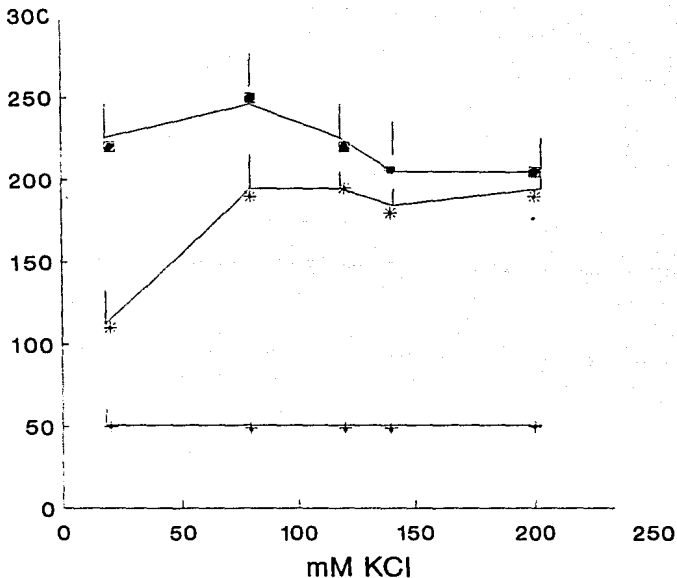


Fig.10 Efecto del Ca²⁺ sobre la actividad del translocador de adenín nucleótidos en presencia de ADP. Las mitocondrias (1 mg/ml) se incubaron en el medio KME (KCl 120 mM, MOPS 25 mM y EGTA 0.5 mM, pH 7.2) a 34°C en presencia de succinato 5 mM, rotenona 1 μM, glucosa 12.5 mM y 10 μl de hexoquinasa (2 U/ml) diluida 1:4 en presencia (371 nM) (+) o en ausencia (·) de Ca²⁺. Después de 7 min. de preincubación se agregó 2 mM de arsenato inorgánico y 0.4 mM de ADP tanto a las mitocondrias incubadas en presencia (■) como a las incubadas en ausencia (*) de Ca²⁺. Los valores representan X ± E.S. (3).

ngat O₂ /min mg

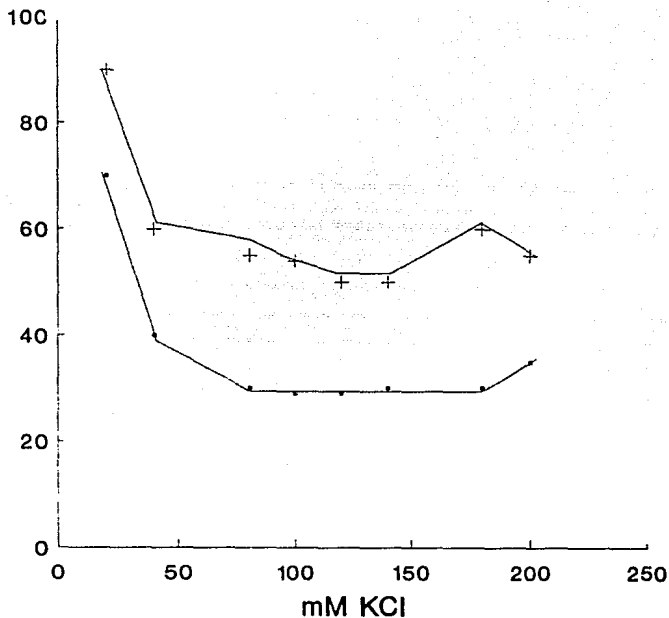


Fig.11 Efecto del Ca²⁺ sobre la velocidad de respiración en el estado 4. Las mitocondrias (1 mg/ml) se incubaron en el medio KME (KCl 120 mM, MOPS 25 mM y EGTA 0.5 mM pH 7.2) a 34°C en presencia de K²HPO₄ 5.2 mM, succinato 5 mM y rotenona 1 μM y en presencia (371 nM) (*) o en ausencia (·) de Ca²⁺. Los valores representan el consumo de oxígeno de experimentos representativos.

ngat O₂ /min mg

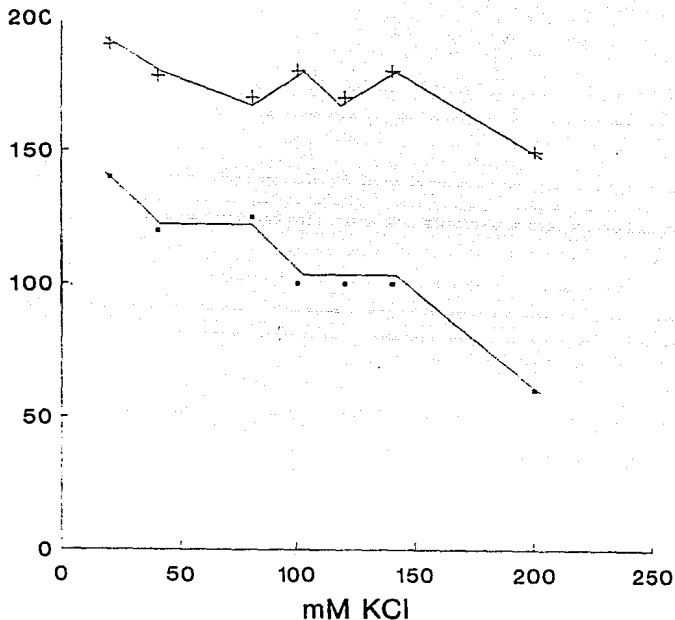


Fig.12 Efecto del Ca²⁺ sobre la velocidad de respiración en el estado 3. Las mitocondrias se incubaron en el medio KME (KCl 120 mM, MOPS 25 mM y EGTA 0.5 mM, pH 7.2) a 34°C en presencia de K₂HPO₄ 5.2 mM, succinato 5 mM y rotenona 1 μM y en presencia (371 nM) (+) o en ausencia (·) de Ca²⁺. Después de 7 min. de preincubación se agregó 0.4 mM de ADP. Los valores representativos.

Como se mencionó anteriormente, el efecto del Ca^{2+} sobre la respiración mitocondrial es mayor en presencia de K^+ (incubando las mitocondrias en el medio KME) que en ausencia de este ión (incubando las mitocondrias en el medio SHE) (tabla 1), así que decidimos evaluar que papel desempeña el K^+ en la estimulación de la respiración por Ca^{2+} .

Repetimos los ensayos de consumo de oxígeno en presencia y ausencia de Ca^{2+} a diferentes osmolaridades, pero utilizando efectores osmóticos diferentes al K^+ . Encontramos que cuando se utiliza colina o sacarosa como soporte osmótico a concentraciones equivalentes a las utilizadas de K^+ no hay cambios en la velocidad de respiración a ninguna de las osmolaridades ensayadas, en cambio, en el estado 3 de la respiración, el efecto activador del Ca^{2+} se presentó en todos estos medios (tabla 4).

Hinchamiento mitocondrial:

Se ensayó el hinchamiento mitocondrial en diferentes condiciones y medios para determinar la relación que existe entre los efectos observados y la inducción de hinchamiento mitocondrial.

En un trazo típico de hinchamiento mitocondrial (fig. 13), puede observarse que las mitocondrias al entrar en contacto con el medio de incubación tienden a hincharse lentamente (fig. 13 trazo a), y cuando se agrega el sustrato (en este caso succinato), se hinchan más rápidamente (fig. 13 trazo b). Esta velocidad de hinchamiento va disminuyendo hasta alcanzar valores similares a los obtenidos en ausencia de sustrato. A diferencia de la adición de sustrato, con la adición de ADP las mitocondrias se contraen (fig. 13 trazo c).

Tabla 4 Efecto del Ca^{2+} (371 nM) sobre la velocidad de respiración en medios con efectores osmóticos distintos al KCl.

mM de colina en el medio	Ca^{2+}	ngat O / min mg	
		estado 4	estado 3
20	-	141.52 ± 4.68 (3)	140.43 ± 24.79 (3)
20	+	95.49 ± 5.51 (3)	225.74 ± 1.99 (3)
120	-	60.85 ± 7.71 (3)	147.88 ± 14.98 (3)
120	+	73.91 ± 5.17 (3)	169.51 ± 12.82 (3)
200	-	92.88 ± 4.50 (3)	187.69 ± 16.39 (3)
200	+	107.56 ± 14.30 (3)	230.71 ± 17.28 (3)

mM de sacarosa en el medio	Ca^{2+}	ngat O / min mg	
		estado 4	estado 3
42	-	36.07 (2)	24.05 (2)
42	+	30.61 (2)	50.29 (2)
250	-	16.39 (2)	19.68 (2)
250	+	17.49 (2)	41.54 (2)
471	-	24.05 (2)	34.98 (2)
417	-	29.51 (2)	42.63 (2)

Las mitocondrias se incubaron como en la tabla 1, pero se substituyó el KCl del medio por las concentraciones indicadas de sacarosa o colina. Los valores representan $\bar{X} \pm E.S.$ (n).

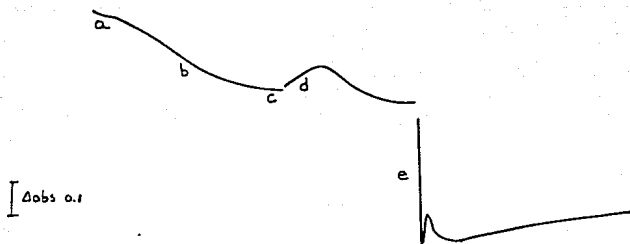


Fig.13 Hinchamiento mitocondrial. Las mitocondrias (1 mg/ml) se incuban en el medio KME (KCl 120 mM, MOPS 25 mM y EGTA 0.5 mM pH 7.2) a 14°C, en presencia de K_2HPO_4 5.2 mM, con lo que tienden a hincharse lentamente (a) Después de agregar succinato 5 mM, la velocidad de hinchamiento aumenta (b), regresando a la velocidad inicial (c). Al agregar ADP 0.4 mM las mitocondrias tienden a contraerse (d). Y al agregar 11.8 pmol/ml de valinomicina se hinchan completamente. El hinchamiento se mide por disminución de absorbancia a 540 nm.

Para corregir los valores obtenidos contra un máximo de hinchamiento mitocondrial se agregó al final de cada ensayo valinomicina (5.64 $\mu\text{mol/ml}$) lo que produce un incremento de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial al K^+ , con la consecuente entrada de agua y aumento del volumen mitocondrial. Se tomó como parametro de comparación el hinchamiento producido por el sustrato bajo las distintas condiciones y comparado con el 100% de hinchamiento de cada ensayo.

Incubando a las mitocondrias en el medio KME, los hinchamientos producidos por el sustrato fueron mayores en el medio hipotónico que en los medios isotónico e hipertónico. El Ca^{2+} produjo un hinchamiento adicional en cada uno de estos medios (tabla 5),.

Al evaluar el hinchamiento mitocondrial en los medios con soportes osmóticos diferentes a K^+ , se encontró que el hinchamiento mitocondrial no es mayor en condiciones hipotónicas, como ocurre en el medio con K^+ como soporte osmótico (tabla 6). Lo anterior sugiere que el mecanismo de activación de la respiración por Ca^{2+} que involucra hinchamiento mitocondrial es dependiente de la presencia de K^+ en el medio.

Variando la concentración de K^+ sin variar la osmolaridad (sustituyendo al K^+ por colina), se observó un aumento de la velocidad de respiración tanto en estado 3 como en estado 4 a concentraciones crecientes de K^+ y una mayor activación de la respiración debida al Ca^{2+} en medios con mayor contenido de K^+ (fig. 14).respiración por Ca^{2+} que involucra hinchamiento mitocondrial es dependiente de la presencia de K^+ en el medio.

Variando la concentración de K^+ sin variar la osmolaridad (sustituyendo al K^+ por colina), se observó un aumento de la

Tabla 5 Efecto del Ca^{2+} (371 nM) sobre el hinchamiento mitocondrial en medios con distintas osmolaridades, en presencia de KCl como efector osmótico.

mM KCl	Ca^{2+}	% Hinchamiento
20	-	51.62
20	+	68.37
120	-	13.50
120	+	24.50
200	-	22.79
200	+	23.58

Las mitocondrias fueron incubadas como en la figura 13, y se calculó el porcentaje de hinchamiento producido por el sustrato, comparado con el 100% de hinchamiento debido a la adición de valinomicina.

Tabla 6 Efecto del Ca^{2+} (371 nM) sobre el hinchamiento mitocondrial en medios con distintas osmolaridades utilizando efectores osmóticos diferentes al KCl.

mM Colina	Ca^{2+}	% Hinchamiento
20	-	70.50
20	+	28.50
120	-	12.97
120	+	11.64
200	-	23.77
200	+	15.00
mM Sacarosa	Ca^{2+}	% Hinchamiento
42	-	4.69
42	+	50.52
250	-	19.00
250	+	22.50
417	-	54.63
417	+	41.57

Las mitocondrias fueron incubadas como en la tabla 5, pero el medio contenía las concentraciones indicadas de sacarosa o colina en vez de KCl.

ngat O₂/min mg

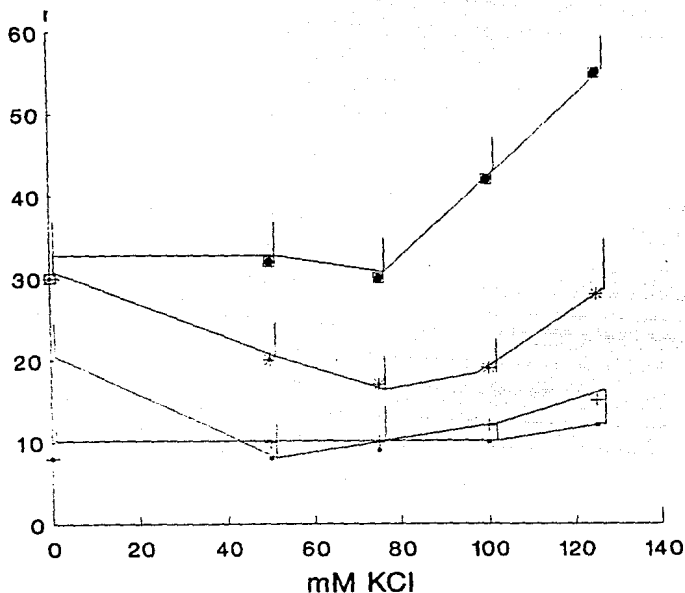


Fig. 14 Efecto del K⁺ sobre la velocidad de respiración en presencia (371 nM) o en ausencia de Ca²⁺. Las mitocondrias (1 mg/ml) se incuban en un medio que contiene MOPS 25 mM y EGTA 0.5 mM pH 7.2 a 34°C con distintas concentraciones de KCl y colina (condiciones isotónicas), en presencia de K₂HPO₄ 5.2 mM, succinato 5 mM y rotenona 1 μM en presencia (371 nM) (+) o en ausencia (·) de Ca²⁺. Después de 7 min. de preincubación se agregó 0.4 mM de ADP tanto a las mitocondrias incubadas en presencia (■) como a las incubadas en ausencia (*) de Ca²⁺. Los valores representan X ± E.S. (3).

velocidad de respiración tanto en estado 3 como en estado 4 a concentraciones crecientes de K^+ y una mayor activación de la respiración debida al Ca^{2+} en medios con mayor contenido de K^+ (fig. 14).

Papel del K^+ en la activación de la respiración por Ca^{2+} :

La influencia que el K^+ tiene sobre el efecto activador del Ca^{2+} puede observarse también cuando se evalúa este fenómeno en presencia de piruvato como sustrato (fig. 15), en este caso se utilizaron mitocondrias carentes de K^+ (menos de 16 mM de K^+ interno) para compararlas con las mitocondrias control (100 mM de K^+ interno) (tabla 7).

El Ca^{2+} produjo un mayor incremento en la actividad de piruvato deshidrogenasa en las mitocondrias control que en las carentes de potasio. Esta activación puede llegar a niveles similares a los obtenidos con mitocondrias control si se agrega K^+ al medio (tabla 8).

El Ca^{2+} produjo un mayor incremento en la actividad de piruvato deshidrogenasa en las mitocondrias control que en las depletadas de potasio. Esta activación puede ser incrementada a niveles similares a los obtenidos con mitocondrias control si se agrega K^+ al medio (tabla 8).

Esto nos sugirió que probablemente el efecto del K^+ esté relacionado con la disponibilidad del Ca^{2+} para interactuar con los complejos enzimáticos mitocondriales a los que activa.

Medimos directamente la concentración de Ca^{2+} libre interno y encontramos que en las mitocondrias carentes de K^+ la concentración de Ca^{2+} libre fué menor que en mitocondrias control, con adiciones similares del amortiguador Ca^{2+} /EGTA (fig. 16).

Tabla 7 Concentración intramitocondrial de K^+ (mM) en mitocondrias control y depletadas de K^+

Mitocondrias control	100.125 ± 11.48 (4)
Mitocondrias depletadas de K^+	16.58 ± 6.48 (4)

Se midió la concentración intramitocondrial de K^+ como se describe en la metodología. Los valores representan $\bar{X} \pm$ E.S.(n)

Tabla 8 Efecto del oxalato sobre la activación de la piruvato deshidrogenasa debida al Ca^{2+} (371 nM).

nM Ca	mM ac.oxálico	nmol NADH/min mg
-	-	13.29
371	-	23.58
371	9.00	10.85
371	6.00	11.06
371	3.00	14.24
371	1.50	14.46

Las mitocondrias fueron incubadas como en la figura 13, pero en presencia de diferentes concentraciones de oxalato. Los valores representan la producción de NADH de experimentos representativos.

% de activación

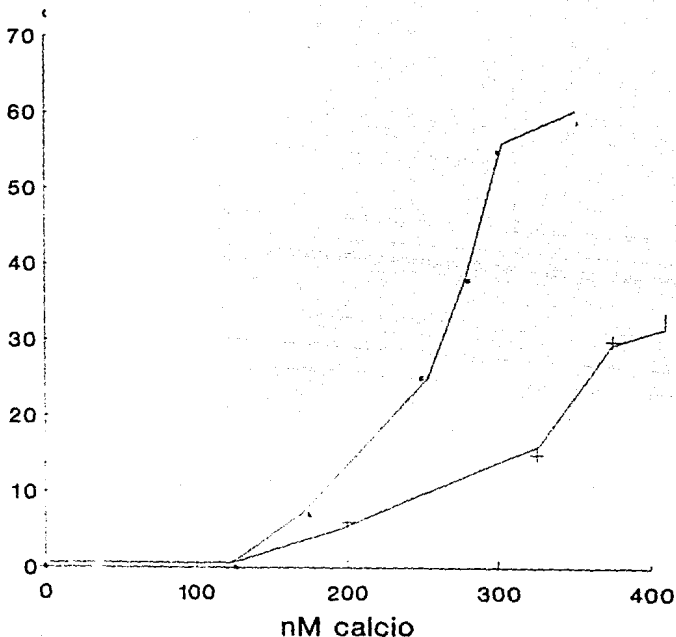


Fig.15 Porcentaje de activación del Ca^{2+} sobre la actividad de la piruvato deshidrogenasa. Las mitocondrias (1 mg/ml) se incuban en el medio KME (KCl 120 mM, MOPS 25 mM y EGTA 0.5 mM pH 7.2) a 34°C, después de 2 min. de preincubación en presencia de las concentraciones indicadas de Ca^{2+} se agregó 0.5 mM de piruvato y se registró la producción de NADH por aumento de absorbancia a 340-370 nm. Los valores representan la producción de NADH de experimentos representativos de mitocondrias control (·) y carentes de K^{+} (+).

Contenido intramitocondrial de calcio (nM)

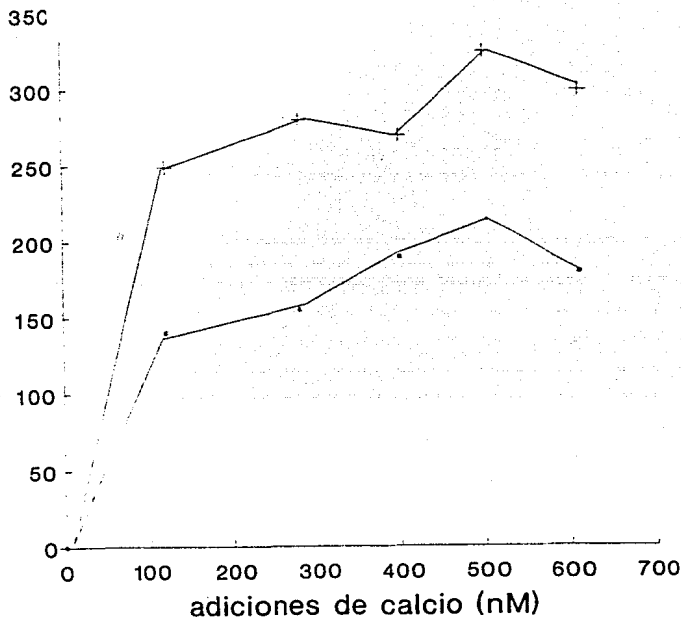


Fig.16 Contenido intramitocondrial de Ca^{2+} . Las mitocondrias se cargaron con fluo-3/AM como se describe en la metodología. Se incubaron (1 mg/ml) en el medio SHE (saca rosa 250 mM, Hepes 5 mM y EGTA 0.5 mM pH 7.2) a 25°C en presencia de las concentraciones indicadas de Ca^{2+} y se registró la fluorescencia de la suspensión, tanto de las mitocondrias control (·) como de las carentes de K^{+} (+). Los valores representan el contenido intramitocondrial de Ca^{2+} de experimentos representativos. Estos valores fueron corregidos con los de fluorescencia máxima y mínima de cada suspensión, como se indica en la metodología.

Contenido intramitocondrial de calcio (nM)

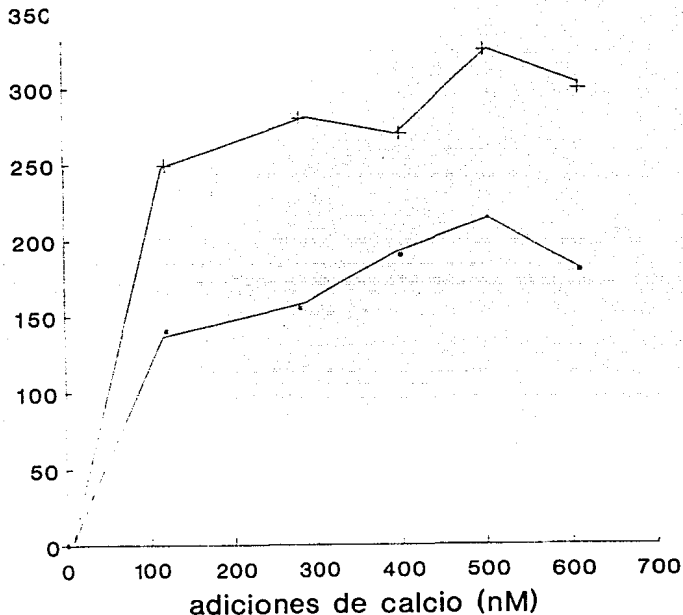


Fig.16 Contenido intramitocondrial de Ca^{2+} . Las mitocondrias se cargaron con fluo-3/AM como se describe en la metodología. Se incubaron (1 mg/ml) en el medio SHE (sacarosa 250 mM, HEPES 5 mM y EGTA 0.5 mM pH 7.2) a 25°C en presencia de las concentraciones indicadas de Ca^{2+} y se registró la fluorescencia de la suspensión, tanto de las mitocondrias control (·) como de las carentes de K^+ (+). Los valores representan el contenido intramitocondrial de Ca^{2+} de experimentos representativos. Estos valores fueron corregidos con los de fluorescencia máxima y mínima de cada suspensión, como se indica en la metodología.

La influencia del K^+ sobre la activación de la respiración por Ca^{2+} no puede atribuirse a que en ausencia de K^+ la captación de Ca^{2+} por la mitocondria esté disminuida (Chávez y cols., 1991). Adicionalmente hicimos ensayos con oxalato, el cual quela al Ca^{2+} y observamos que reduce su concentración intramitocondrial (fig. 17), produciendo un efecto similar al obtenido con mitocondrias carentes de K^+ ya que disminuyó la activación de la piruvato deshidrogenasa por Ca^{2+} (Tabla 8). Esto apoya la idea de que la presencia de K^+ afecta la concentración intramitocondrial de Ca^{2+} .

Sugerimos que este efecto del K^+ se debe a que se une a sitios aniónicos intramitocondriales de unión para Ca^{2+} y permite que un mayor número de iones Ca^{2+} libres se encuentren disponibles para interactuar con los complejos enzimáticos mitocondriales.

Papel del K^+ en la activación de la respiración por Ca^{2+} :

La influencia que el K^+ tiene sobre el efecto activador del Ca^{2+} puede observarse también cuando se evalúa este fenómeno en presencia de piruvato como sustrato (fig. 15), en este caso se utilizaron mitocondrias carentes de K^+ (menos de 16 mM de K^+ interno) para compararlas con las mitocondrias control (100 mM de K^+ interno) (tabla 7).

El Ca^{2+} produjo un mayor incremento en la actividad de piruvato deshidrogenasa en las mitocondrias control que en las carentes de potasio. Esta activación puede ser incrementada a niveles similares a los obtenidos con mitocondrias control si se agrega K^+ al medio (tabla 8).

Esto nos sugirió que probablemente el efecto del K^+ esté relacionado con la disponibilidad del Ca^{2+} para interactuar con los complejos enzimáticos mitocondriales a los que

nM calcio

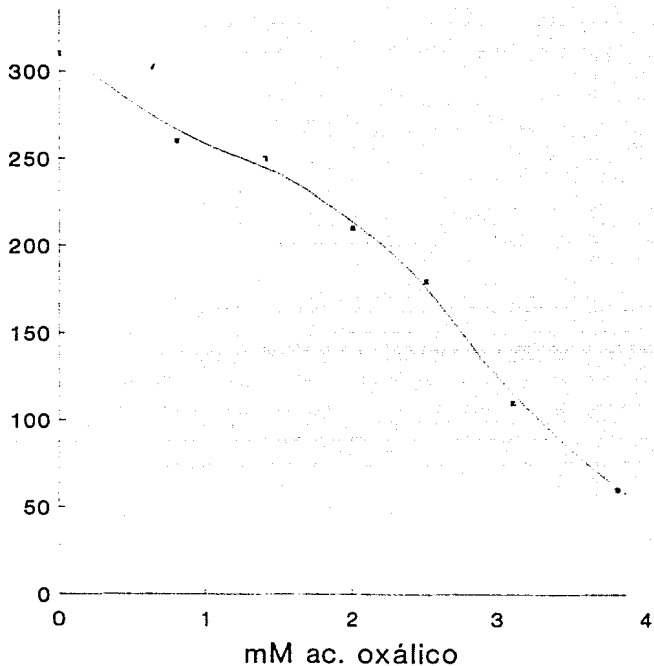


Fig.17 Efecto del oxalato sobre el contenido intramitocondrial de Ca^{2+} . las mitocondrias se cargaron con Fluo-3/AM como se describe en la metodología. Se incubaron en el medio SHE (sacarosa 250 mM, Hepes 5 mM y EGTA 0.5 mM, pH 7.2) a 25°C en presencia de Ca^{2+} 371 nM y las concentraciones indicadas de oxalato. Se registró la fluorescencia de las suspensiones y se corrigieron los valores contra la fluorescencia máxima y mínima como se describe en la metodología. Los valores representan el contenido intramitocondrial de experimentos representativos.

activa.

Medimos directamente la concentración de Ca^{2+} libre interno y encontramos que en las mitocondrias carentes de K^+ la concentración de Ca^{2+} libre fué menor en las mitocondrias carentes de K^+ que en mitocondrias control, con adiciones similares del amortiguador $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$ (fig. 16).

La influencia del K^+ sobre la activación de la respiración por Ca^{2+} no puede atribuirse a que en ausencia de K^+ la captación de Ca^{2+} por la mitocondria esté disminuida (Chávez y cols., 1991), ya que en estas condiciones la captación mitocondrial de Ca^{2+} medida con calcio radioactivo es la misma que para mitocondrias control. Adicionalmente hicimos ensayos con oxalato, el cual quela al Ca^{2+} y observamos que reduce la concentración intramitocondrial de Ca^{2+} (fig. 17), produciendo un efecto similar al obtenido con mitocondrias depletadas de K^+ ya que disminuyó la activación de la piruvato deshidrogenasa por Ca^{2+} (Tabla 8). Esto apoya la idea de que la presencia de K^+ afecta la concentración intramitocondrial de Ca^{2+} .

Sugerimos que este efecto del K^+ se debe a que se une a sitios aniónicos intramitocondriales de union para Ca^{2+} y permite que un mayor número de iones Ca^{2+} libres se encuentren disponibles para interactuar con los complejos enzimáticos mitocondriales, principalmente sobre el complejo bcl mitocondrial y el acarreador de adenín nucleótidos.

Discusión

El efecto del Ca^{2+} sobre la fosforilación oxidativa ha sido estudiado ampliamente. A altas concentraciones, este ión produce inhibición de la respiración (Jacobus y cols., 1975), pero existe un rango de concentraciones, alrededor de 10^{-6} M en el que induce una máxima estimulación tanto del consumo de oxígeno como de la síntesis de ATP (Moreno-Sánchez, 1985a). Dicho rango de concentraciones corresponde con el rango en el que el Ca^{2+} intracelular varía en condiciones fisiológicas (Murphy y cols., 1980). Por esta razón, nuestros experimentos fueron hechos con una concentración de Ca^{2+} alrededor de 300 nM.

El efecto del Ca^{2+} no fue debido a un desacoplamiento mitocondrial, ya que los controles respiratorios permanecieron inalterados. Se había sugerido que éste era el mecanismo de activación de la respiración por Ca^{2+} , (Murphy, 1962), pero las concentraciones de Ca^{2+} que se usaban eran mucho más altas (en el rango milimolar) y por lo tanto carentes de significado fisiológico.

La entrada de Ca^{2+} por sí misma tampoco es la responsable del aumento en la velocidad de consumo de O_2 como algunos autores sugerían (Vercesi y cols., 1978), ya que si la competencia por la energía del gradiente electroquímico de protones fuera tan importante como para limitar la producción de ATP, el consumo de O_2 en el estado 3 se vería disminuido y por el contrario, fue estimulado en presencia de Ca^{2+} . La entrada de Ca^{2+} limita la velocidad de síntesis de ATP solo a altas concentraciones (en el rango milimolar).

Aparentemente el Ca^{2+} tiende a salirse de la mitocondria con largos tiempos de preincubación, y por esto la velocidad de respiración fue mayor con tiempos cortos de preincubación; esto es congruente con el hecho de que el efecto del Ca^{2+}

fue mayor entre más tiempo se preincubaron las mitocondrias, ya que al contener menos Ca^{2+} , el Ca^{2+} que agregamos produce una mayor estimulación de la respiración.

El Ca^{2+} aumento la actividad de la piruvato deshidrogenasa, el acarreador de adenín nucleótidos y el complejo bcl mitocondrial. Esto había sido sugerido por otros autores (Moreno-Sánchez, 1985b; Murphy y cols., 1990). La actividad del translocador de adenín nucleótidos y el complejo bcl mitocondrial parecen ser activados por el Ca^{2+} mediante mecanismos diferentes. En el caso de la actividad de piruvato deshidrogenasa no se evaluó el mecanismo de activación por Ca^{2+} , pero se conoce que se activa mediante un aumento en la actividad de la piruvato deshidrogenasa fosfatasa (Hughes et.al. 1981).

El efecto del Ca^{2+} sobre el complejo bcl mitocondrial recuerda los resultados de los primeros estudios del efecto del ión sobre la respiración mitocondrial (Vercesi, y cols., 1978), en los que se utilizaban altas concentraciones de Ca^{2+} . El Ca^{2+} incrementa el consumo de O_2 , que después disminuye hasta alcanzar la velocidad inicial, y una nueva adición del ión o de ADP produce este mismo efecto. Probablemente el complejo bcl sea extremadamente sensible al Ca^{2+} , y uno de los principales responsables del efecto de este ión sobre el flujo total de la vía de fosforilación oxidativa.

El efecto del Ca^{2+} sobre el acarreador de adenín nucleótidos es de gran importancia si se toma en cuenta que es un punto de regulación de la vía que por largo tiempo ha sido reconocido (Williams, 1956) y que representa la comunicación entre la actividad citoplásmica y el metabolismo mitocondrial.

Aparentemente existe una relación entre la captación

mitocondrial de Ca^{2+} y la presencia de ADP (LêQuôc y LêQuôc, 1988). El ADP limita considerablemente la capacidad de la mitocondria de captar Ca^{2+} . En nuestros experimentos, el Ca^{2+} aumentó la actividad de este translocador, y tomando en cuenta la relación entre la presencia de ADP y la captación mitocondrial de Ca^{2+} , al alcanzar cierta concentración de ADP se aseguraría que el flujo de la vía no fuera incrementado aun más por el Ca^{2+} .

Nuestros resultados indican que el translocador de adenín nucleótidos y el complejo bcl mitocondrial son los dos puntos más importantes de regulación de la respiración por Ca^{2+} , pero no se evaluaron absolutamente todas las enzimas que componen a la vía.

En los ensayos en presencia de succinato y rotenona se utilizó una concentración saturante de este sustrato, por tanto no se puede asumir que el Ca^{2+} estimule al complejo de la succinato deshidrogenasa. El complejo de la citocromo oxidasa funciona cerca de su velocidad máxima en condiciones saturantes de O_2 , así que era de esperarse que no encontráramos efecto del Ca^{2+} sobre este complejo, sin embargo, cabe la posibilidad de que en condiciones limitantes de O_2 , en algún tejido pudiera haber un efecto del ión sobre este complejo.

El hecho de no haber encontrado efecto del Ca^{2+} sobre la actividad de hidrólisis de ATP no excluye la posibilidad de que el proceso de síntesis pueda ser regulado por este ión, de hecho esto ha sido sugerido por algunos autores (Moreno-Sánchez, 1985a), pero en sus experimentos no se excluye la participación de otros complejos respiratorios.

Mecanismo de activación de la respiración por Ca^{2+} :

Nuestros resultados indican que pueden estar involucrados en

el efecto del Ca^{2+} varios mecanismos diferentes, en los que interviene o no la inducción de hinchamientos mitocondriales y la presencia de K^+ en el medio.

Por un lado, a las concentraciones utilizadas de Ca^{2+} (en el rango nM) este ión es capaz de provocar hinchamientos mitocondriales, como se ha descrito para concentraciones más altas (Halestrap, 1989) y estos hinchamientos sí están relacionados con el aumento en el consumo de O_2 , ya que hinchamientos inducidos por cambios de osmolaridad producen un efecto similar.

Por otro lado, en ciertos medios, en los que el Ca^{2+} no pudo producir hinchamientos mitocondriales (en ausencia de K^+), el efecto activador de este ión también puede observarse, pero solo en el estado 3 de la respiración. Esto sugiere que el efecto activador del Ca^{2+} no puede atribuirse solamente al aumento del volumen mitocondrial, y que probablemente la respiración sea activada por este mecanismo sólo en el estado 4 de la respiración.

Esto se apoya por el hecho de que las condiciones en las que se incuban las mitocondrias en los ensayos de arsenilación oxidativa, antes de añadir ADP y/o arsenato son las mismas que para evaluar la respiración en estado 4 en el sistema succinato-rotenona, excepto por la ausencia de fosfato en el medio. De modo que el hecho de que no se observe efecto del Ca^{2+} en estas condiciones pone de manifiesto la dependencia de tal efecto en la concentración de fosfato, necesario para producir hinchamientos mitocondriales, según el mecanismo descrito por Halestrap (1989).

La actividad del complejo bcl mitocondrial, así como el consumo de oxígeno en presencia de succinato y rotenona sí son modificados por el cambio en la osmolaridad del medio, sin embargo, la actividad del translocador de adenín

nucleótidos no.

Lo anterior sugiere que la actividad del translocador de adenín nucleótidos es modificada por Ca^{2+} mediante un mecanismo diferente a los hinchamientos mitocondriales. Además, el hecho de que la actividad del complejo bcl y el consumo de oxígeno en presencia de succinato y rotenona también sean modificados por Ca^{2+} en los medios en los que este ión no puede inducir hinchamientos mitocondriales, indica que en el caso de estas dos actividades mitocondriales, sí son modificadas por ambos mecanismos de activación producidos por Ca^{2+} .

Papel del K^+ en la activación de la respiración por Ca^{2+} :

La dependencia del efecto del Ca^{2+} en el soporte osmótico que se utilice se debe principalmente a la presencia o ausencia de K^+ en el medio, ya que los resultados son muy similares entre los medios en que se utilizaron diferentes soportes osmóticos para sustituir al K^+ . No existen evidencias en la literatura de que las concentraciones intramitocondriales de K^+ varíen en determinadas condiciones fisiológicas, sin embargo, es interesante desde el punto de vista del mecanismo por medio del cuál el Ca^{2+} activa la respiración, como se explicó en la la sección anterior.

Como han sugerido algunos autores (Chávez, 1973; Chávez y cols., 1991), el K^+ tiene un importante papel en la regulación de la velocidad de flujo de la vía, participando en los mecanismos de acoplamiento del transporte de electrones con la síntesis de ATP, y modificando la magnitud del efecto que el Ca^{2+} tiene sobre la respiración.

Encontramos una dependencia de la velocidad de consumo de oxígeno con la concentración de K^+ en el medio. Esta dependencia es mayor en el estado 3 que en el estado 4, lo

cual es congruente con el papel que se ha sugerido para este ión en el acoplamiento del transporte electrónico con la síntesis de ATP. Adicionalmente encontramos que el efecto del Ca^{2+} es mayor entre mayor sea la concentración de K^+ en el medio, tanto sobre el consumo de O_2 en presencia de succinato y rotenona, como sobre la actividad de piruvato deshidrogenasa. Esto debido a que como indican las concentraciones de Ca^{2+} libre interno, la concentración de este ión disponible para interactuar con los complejos respiratorios es mayor en presencia de K^+ en el medio. Y esto a su vez es probablemente debido a que el K^+ se une a sitios aniónicos que podrían ser ocupados por Ca^{2+} dentro de la mitocondria. Esto está apoyado por los experimentos en los que se utilizó oxalato para quelar Ca^{2+} dentro de la mitocondria, y disminuir la concentración del ión en forma libre. En estos experimentos disminuyó tanto la activación producida por Ca^{2+} , como la concentración de Ca^{2+} libre interno.

El hecho de que el Ca^{2+} aumente el flujo de la vía de fosforilación oxidativa a través de varios mecanismos diferentes sugiere que en ciertas condiciones se produzca su efecto por uno u otro mecanismo, y abre la posibilidad de la especificidad de tejido para el control de la vía por este ión (fig. 18).

Conclusiones

Nuestros resultados indican que el Ca^{2+} a concentraciones fisiológicas aumenta el flujo de la vía de fosforilación oxidativa principalmente activando al complejo bcl mitocondrial y al translocador de adenín nucleótidos, dentro de la cadena respiratoria, además de su efecto sobre las deshidrogenasas mitocondriales, como la piruvato deshidrogenasa. En el efecto del Ca^{2+} están involucrados dos mecanismos independientes. Uno de ellos es esta mediado por

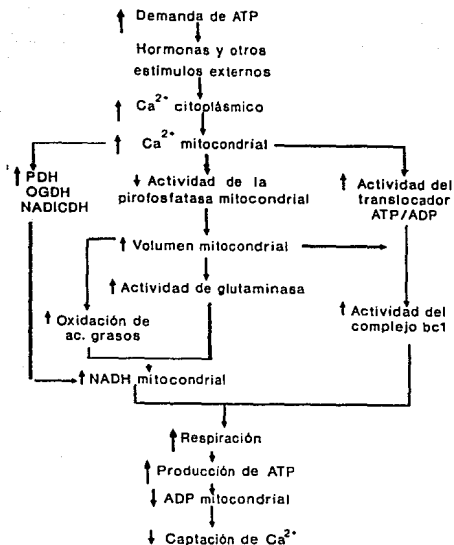


Fig. 18 Mecanismos de regulación de la vía de fosforilación oxidativa. El Ca^{2+} extracelular o liberado del retículo sarcoplásmico, en respuesta a estímulos hormonales o de otro tipo entra a la mitocondria y afecta el flujo de la vía por dos mecanismos independientes, uno de ellos involucra un hinchamiento mitocondrial producido por el aumento en la concentración de P_i intramitocondrial que se produce al bajar la actividad de la pirofosfatasa mitocondrial. El aumento en el volumen mitocondrial produce un aumento en la oxidación de ácidos grasos y en la actividad del complejo bc_1 mitocondrial. Por medio de un mecanismo diferente, el Ca^{2+} aumenta la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales y del aceptor de adenín nucleótidos. El aumento en la producción de ATP hace que disminuya la concentración intramitocondrial de ADP, con lo que la captación de Ca^{2+} también disminuye. Esto puede interpretarse como un ciclo de regulación de la vía de fosforilación oxidativa debido al Ca^{2+} .

hinchamiento mitocondrial y es dependiente de la presencia de K^+ en el medio; afecta principalmente a la respiración en el estado 4. El otro mecanismo no induce hinchamientos mitocondriales, es independiente de la presencia de K^+ en el medio y afecta principalmente a la respiración en el estado 3.

El K^+ no solo influye en el efecto del Ca^{2+} por su participación en la inducción de hinchamiento mitocondrial, sino que su ausencia limita la concentración de Ca^{2+} en forma libre dentro de la mitocondria y con esto la disponibilidad para interactuar con los complejos mitocondriales.

Por último, como se ha mencionado, la concentración de ADP limita la capacidad de la mitocondria para captar Ca^{2+} (LêQuôc y LêQuôc, 1980), esto provee a la mitocondria de un mecanismo para que dos medios de control de la fosforilación oxidativa, uno preferentemente intracelular (la concentración de ADP en el citoplasma), y el otro desencadenado por un estímulo externo (el aumento en la concentración de Ca^{2+}), se excluyan mutuamente.

Bibliografía

- Akerman, K.E.O. y Nicholls, D.G. (1983) *Rev.Physiol. Biochem.Pharmacol.* 9, 149-201
- Altin, J.G. y Bygrave, F.L. (1988) *Biol.Rev.* 63, 551-611
- Altmann, R. (1890) *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen Zuden Zellen.* Veit. Leipzig
- Assimacopoulos-Jeannet, F.D., McCormack, J.G., Prentki, J., Jeanrenaud, B. y Denton, R.M. (1982) *Biochim.Biophys.Acta* 717, 86-90
- Assimacopoulos-Jeannet, F.D., McCormack, J.G. y Jeantenaud, B. (1986) *J.Biol.Chem.* 261, 8799-8804
- Bernardi, P. y Azzone, G.F. (1983) *Biochim.Biophys.Acta* 724, 212-223
- Berthon, B., Binet, A. Mauger, J.B. y Claret, M. (1984) *FEBS Lett.* 167, 19-24
- Binet, A. y Claret, M. (1983) *Biochem.J.* 210, 867-873
- Chance, B. Eleff, J.S., Leigh, D., Sokolow, I. y Sapega, A. (1981) *Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A)* 78, 6714-6718
- Chance, B. y Williams, G.R. (1956) *Arch.Enzymol.* 17, 65-134
- Charest, R., Blackmore, P.F., Berthon, B. y Exton, J.H. (1983) *J.Biol.Chem* 278, 8769-8773
- Chávez, E. (1973) *FEBS Lett.* 33, 129-131
- Chávez, E., Moreno-Sánchez, R., Zazueta, C., Reyes-Vivas, H. y Arteaga, D. (1991) *Biochim.Biophys.Acta* 1070 (1991) 461-466
- Cleland, K.W. y Slater, E.C. (1953) *Q.J.Microsc.Sci.* 94, 329-346
- Davidson, A.M. y Halestrap, A.P. (1987) *Biochem.J.* 246, 715-723
- Davidson, A.M. y Halestrap, A.P. (1988) *Biochem.J.* 254, 379-384
- Dehaye, J.P., Hughes, B.P., Blackmores, P.F. y Exton, J.H. (1981) *Biochem.J.* 194, 946-956
- Denton, R.M., Coore, H.G., Martin, B.R. y Randle, P.J. (1971) *Nature* 231, 113-116

- Denton, R.M., Randle, P.J. y Martin, B.R. (1972) *Biochem.J.* 128, 161-163
- Denton, R.M., Richards, D.A. y Chin, J.G. (1978) *Biochem.J.* 176, 899-906
- Denton, R.M. y McCormack, J.G. (1980) *FEBS Lett.* 119, 1-8
- Denton, R.M. y McCormack, J.G. (1985) *Am.J.Physiol.* 249, E543-E554
- Denton, R.M., McCormack, J.G. y Thomas, A.P. (1986) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 488, 370-384
- Dussiere, J. Ligeti, E., Brandolin, B. y Vignais, P.V. (1984) *Biochim.Biophys.Acta* 766, 492-500
- Duszynski, J. y Wojtczak, L. (1977) *Biochim.Biophys.Res.Commun.* 74. 417-424
- Fabiato, A. (1988) *Methods in Enzimology* (Fleisher, S. and Fleischer, B. eds.) Vol. 157, 378-411. Academic Press, San Diego, Ca.
- Foldes, M. y Barritt, G.J. (1977) *J.Biol.Chem.* 152, 5372-5380
- Garrison, J.C. y Haynes, R.C.Jr. (1975) *J.Biol.Chem.* 254, 1129-1133
- Gómez-Puyou, A., Sandoval, F. Tuena, M., Peña, A. y Chávez, E. (1969) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 36, 316-321
- Gómez-Puyou, A., Sandoval, F., Chávez, E. y Tuena, M. (1970) *J.Biol.Chem.* 245, 5239-5247
- González-Halphen, D. y Gómez-Logero, C. (1982) *Bolitin de Educación Bioquímica* 1, 4-20
- Groen, A.K., Vervoorn, R.C., Vander Meer, R. y Tager, J.M. (1983) *J.Biol.Chem.* 258, 14346-14353
- Groen, A.K., Wanders, R.J.A., Westerhoff, H.V., Van der Meer, R. y Tager, J.M. (1982) *J.Biol.Chem.* 257, 2754-2757
- Hackenbrock, C.R., Chazotte, B. y Gupte, S. *J.Bioenerg.Biomembr.* 18, 331-367
- Halestrap, A.P. (1985) *Biochem.Soc.Trans.* 13, 655-669
- Halestrap, A.P., Quinlan, P.T., Whipps, D.E. y Armston, A.E. (1986) *Biochem.J.* 236, 779-787

- Halestrap, A.P. (1989) *Biochim.Biophys.Acta* 973, 335-382
- Halestrap, A.P. y Davidson, A.M. (1990) *Biochem.J.* 268, 153-160
- Hampson, R.K., Barron, L.L. y Olson, M.S. (1983) *J.Biol.Chem.* 258, 2993-2999
- Hansford, R.G. y Chappell, J.B. (1967) *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 27, 686-692
- Hansford, R.G. (1980) *Curr.Top.Bioenerg.* 10, 217-278
- Hansford, R.G. (1985) *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* 103, 1-72
- Hatefi, Y. (1985) *Ann.Rev.Biochem.* 54, 1015-1069
- Hillered, L., Muchiri, P.M., Nordenbrand, K. y Ernster, L. (1983) *FEBS Lett.* 154, 247-250
- Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. y Palade, G.E. (1948) *J.Biol.Chem.* 172, 619-635
- Hughes, W.A., Brownsey, R.W. y Denton, R.M. (1981) *Biochem.J.* 192, 469-481
- Jacobus, W.E., Tiozzo, R., Lugli, G., Lehninger, A.L. y Carafoli, E: (1975) *J.Biol.Chem.* 250, 7863-7870
- Jacobus, W.E., Moreadith, R.W. y Vandegaer, K.M. (1982) *J.Biol.Chem.* 257, 2397-2402
- Jacser, H. y Burns, J.A. (1979) *Biochem.Soc.Trans.* 7, 1149-1160
- Jones, D.P. (1986) *Am.J.Physiol.* 250, c663-c675
- Kennedy, E.P. y Lehninger (1949) *J.Biol.Chem.* 179, 957-972
- Krämer, R. (1985) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 127, 129-135
- Kraus-Friedman, N. (1986) *Trends.Biochem.Sci.* 11, 276-279
- Kotlyar, A.B., Sled, U.D. y Vinogradou, A.D. (1992) *Biochim.Biophys.Acta* 1098, 144-150
- LaNoue, K.F. y Schoowerth, A.C. (1979) *Ann.Rev.Biochem.* 48, 871-922
- LêQuôc, K. y LêQuôc, D. (1988) *Arch.Biochem.Biophys.* 265, 249-257
- Lehninger, A.L. (1958) *Science*, 128, 450

- Lehninger, A.L. (1962) *Physiol.Revs.* 42, 467
- Malmström, K. and Carafoli, E. (1977) *Arch.Biochem.Biophys.* 182, 657-666
- Mattheus, P.M., Bland, J.L., Gadian, D.G. y Radda, G.K. (1982) *Biochim.Biophys.Acta* 721, 312-320
- McCormack, J.G. y Denton, R.M. (1980) *Biochem.J.* 190, 95-105
- McCormack, J.G. y Denton, R.M. (1981) *Biochem.J.* 196, 619-624
- McCormack, J.G. y England, P.J. (1983) *Biochem.J.* 214, 581-585
- McCormack, J.G. (1985) *Biochem.J.* 231, 597-608
- McCormack, J.G., Halestrap, A.P. y Denton, R.M. (1990) *Physiol. Rev.* 70, 1-35
- Moore, C.L. (1971) *Biochem.Biophys.ResCommun.* 42, 298-305
- Moreno-Sánchez, R. (1985a) *J.Biol.Chem.* 260, 4028-4034.
- Moreno-Sánchez, R. (1985b) *J.Biol.Chem.* 260, 12554-12560
- Moreno-Sánchez, R. y Hansford, R.G. (1988) *Biochem.J.* 256, 403-412
- Murphy, A.N., Kelleher, J.K. y Fiskum, G. (1990) *J.Biol.Chem.* 265, 10527-10534
- Murphy, E. Coll, K., Rich, T.L. y Williamson, J.R. (1980) *J.Biol.Chem.* 255, 6600-6608
- Newsholme, E.A. y Leech, A.R. (1983) *Biochemistry for the Medical Sciences*, John Wiley and sons, Chichester, Cap. 4)
- Nicholls, D.G. (1974) *Eur.J.Biochem.* 49, 585-593
- Nicholls, D.G. (1977) *Eur.J.Biochem.* 77, 349-356
- Nicholls, D.G. y Akerman, K. (1982) *Biochim.Biophys.Acta* 683, 57-88
- Oviasu, O.A. y Whitton, P.D. (1984) *Biochem.J.* 224, 181-186
- Palade, G.E. (1952) *Anat.Rec.* 114, 427-451
- Panov, A., Filippova, S. y Lyaknovich, V. (1980) *Arch.Biochem.Biophys.* 199, 420-426

- Puskin, J., Bunter, T.E., Gunter, K.K. y Rusell, R.R. (1976) *Biochem.* 15, 3842
- Quinlan, P.T. y Halestrap, A.P. (1986) *Biochem.J.* 230, 789-800
- Reinhart, P.H., Taylor, W.M. y Bygrave, F.L. (1984) *Biochem.J.* 223, 1-13
- Robertson, S.P., Potter, J.D. and Rouslin, W. (1982) *J.Biol.Chem.* 257, 1743-1748
- Rossi, C.S. y Lehninger, A.L. (1964) *J.Biol.Chem.* 239, 3971-3980
- Saavedra-Molina, A., Uribe, S. y Devlin, M. (1990) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 167, 148-153
- Saida, K. y Nonomura, Y. (1978) *J.Gen.Physiol.* 72, 1-14
- Sánchez Olivarría, J., Lambers, A. y van Dam, K. (1988) *Biochim.Biophys.Acta* 936, 108-113
- Sjöstrand, F.S. (1953) *Nature(Londres)* 171, 30-32
- Sordahl, L.A. (1975) *Arch.Biochem.Biophys* 167, 104-115
- Standdon, J.M. y Hansford, R.G. (1986) *Biochem.J.* 238, 737-743
- Standdon, J.M. y Hansford, R.G. (1989) *Eur.J.Biochem.* 179, 47-52
- Sttocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. y Bergstrand, A. (1967) *J.Cell.Biol.* 32, 415-438
- Taylor, W.M., Reinhart, P.H. y Bygrave, F.L. (1983) *Biochem.J.* 212, 555-565
- Thomas, A.P., Alexander, J. y Williamson, J.R. (1984) *J.Biol.Chem.* 259, 5574-5584
- Titheradge, M.A. y Hynes, R.C. (1980) *Arch.Biochem.Biophys.* 201, 44-55
- Tsien, R.W. (1983) *Ann.Rev.Physiol.* 78, 457-497
- Tutheradge, M.A. y Haynes, R.C. (1980) *Arch.Biochem.Biophys.* 201, 44-55
- Vasington, F.D. y Murphy, J.V. (1962) *J.Biol.Chem.* 237, 2670
- Verces, A., Reynafarje, B. y Lehninger, A.L. (1978) *J.Biol.Chem.* 253, 6369-6385

Wojtczak, L. y Lehninger, A.L. (1961) Biochim.Biophys.Acta
51, 442

Abreviaturas

ADP	adenosin difosfato
Ars	arsenato inorgánico
ATP	adenosin trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
CCCP	carbonilcianato-m-clorofenilhidrazona
cit.	citocromo
DNA	ácido desoxiribonucleico
EGTA	ácido etilenglicolbis(β-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetracético
Hepes	ácido 4-(2-hydroxyetil)-1-piperazinasulfónico
MOPS	ácido 3-(n-morfolino)propanosulfónico
Pi	fosfato inorgánico
Ppi	pirofosfato
RNA	ácido ribonucleico
TMPD	N,N,N,N',N' tetrametil-p-fenilendiamina
Tris	Tris(hidroxi)etilamino metano
U	Unidad de actividad enzimática. Una unidad causa la formación de 1 μmol de NADH por minuto a pH 8.2 y 25°C