

Nº 85
R.V.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CONTROL DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA Y
TRANSPORTE DE Ca^{2+} EN MITOCONDRIAS
DE MAMIFERO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
FRANCISCO JAVIER LOPEZ GOMEZ



MEXICO, D. F.,

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

| Indice. | pág. |
|---|-------------|
| Introducción | 3 |
| Capítulo I. | |
| 1.1. Antecedentes | 60 |
| 1.1.1. Teoría de control metabólico | 61 |
| 1.1.1.1. Coeficiente de control de flujo | 62 |
| 1.1.1.2. medición cuantitativa de los coeficientes de control de flujo | 64 |
| 1.1.1.3. Coeficiente de elasticidad y teorema de elasticidad | 67 |
| 1.1.1.4. Estudios de control a nivel de la fosforilación oxidativa | 68 |
| 1.1.1.5. Un nuevo modelo para estudios de control metabólico | 72 |
| 1.1.2. Indicadores fluorescentes para Ca^{2+} una nueva manera de estudiar eventos relacionados con Ca^{2+} | 81 |
| Capítulo II. | |
| 1.2. Objetivos | 86 |
| Capítulo III. | |
| 1.3. Materiales y métodos | 89 |
| 1.3.1. Conservación de la línea tumoral | 89 |
| 1.3.2. Aislamiento de mitocondrias de hepatoma AS-30D | 89 |
| 1.3.3. Medición del control respiratorio | 89 |
| 1.3.4. Evaluación cuantitativa de los C_i | 90 |

| | |
|--|-----|
| 1.3.5. Medición de la cantidad de proteína mitocondrial | 91 |
| 1.3.6. Medición del potencial transmembranal | 91 |
| 1.3.7. Obtención de mitocondrias de corazón | 91 |
| 1.3.8. Medición de la concentración de Ca^{2+} externo y la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial | 92 |
| 1.3.9. Control de las concentraciones de Ca^{2+} | 92 |
| Capítulo IV. | |
| 1.4. Resultados | 94 |
| 1.4.1. Control de la fosforilación oxidativa | 94 |
| 1.4.2. Transporte de Ca^{2+} mitocondrial | 106 |
| 1.4.2.1. Intercambiador Na^+/Ca^{2+} | 111 |
| 1.4.2.2. Intercambiador H^+/Ca^{2+} | 117 |
| 1.4.2.3. Otros mecanismos de eflujo de Ca^{2+} | 122 |
| Capítulo V. | |
| 1.5. Discusión | 128 |
| 1.5.1. Control de la fosforilación oxidativa | 128 |
| 1.5.2. Transporte de Ca^{2+} mitocondrial | 134 |
| 1.5.2.1. Intercambiador Na^+/Ca^{2+} | 134 |
| 1.5.2.2. Intercambiador H^+/Ca^{2+} | 137 |
| 1.5.2.3. Otros mecanismos de eflujo de Ca^{2+} | 139 |
| Conclusiones | 141 |
| Bibliografía | 143 |

INTRODUCCION

La célula eucariota es una estructura altamente organizada, la cual divide sus funciones en diferentes compartimientos denominados organelos. Uno de ellos ha recibido especial atención en el área de la Bioenergética, particularmente porque lleva a cabo muchas o casi todas las reacciones de síntesis de compuestos que sirven como reservorios de energía (formación de ATP); a este organelo se le ha denominado como mitocondria. (figura I).

La mitocondria es un organelo aerobio, generalmente el número de ellas varía de tejido a tejido y se relaciona de forma directa con los requerimientos energéticos del mismo. Su volumen también varía; medido *in situ* en corazón es de $0.2\mu^3$ [3].

Poseen una cubierta formada por dos capas: Una membrana externa que es lisa y algo elástica, y una membrana interna que tiene pliegues internos o invaginaciones llamadas crestas, con un líquido acuoso llenando el espacio que queda entre ambas membranas; y en el interior del compartimiento interno se halla la matriz. [1-4].

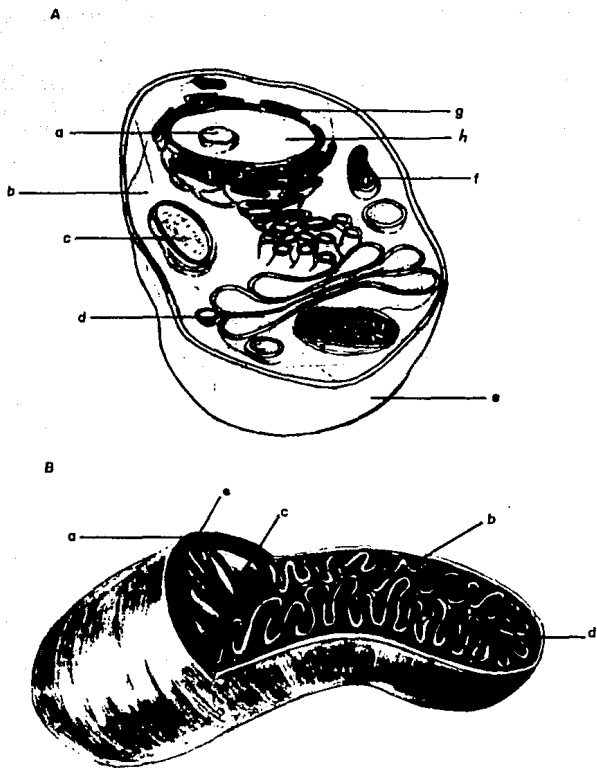


Figura 1. (A) Representación de una célula eucariote de mamífero, con sus respectivos organelos subcelulares: (h) Núcleo, (g) Reticulo sarcoplásmico, (d) Aparato de golgi, (a) Nucleolo, (f) Mitochondria, (e) Membrana plasmática, (c) Lisosoma.

(B) Representación de una mitocondria y sus componentes: (a) Membrana externa, (b) Membrana interna, (d) Crestas, (e) Espacio intermembranal, (c) Matriz.

Membrana externa:

Al igual que la interna se compone fundamentalmente por dos materiales aparte de sus partículas ligadas. El principal material componente es una proteína estructural que en su forma habitual es totalmente insoluble en agua, y el segundo es un lípido, el cual se encuentra casi por completo como fosfolípido insoluble en agua como una combinación estructural denominada como micela. [2].

Esta membrana externa es rica en fosfolípidos, y contiene una apreciable cantidad de colesterol, además es permeable a la mayoría de los iones y moléculas porque contiene muchas copias de porina, una proteína transmembranal con un gran poro, la cual permite el paso libre de sustancias con peso molecular menor a 10,000 Da. [1,5].

En ésta porción se sitúan diversas enzimas, tales como el sistema NADH-citocromo c oxidoreductasa y las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ciclo-TCA), o ciclo de Krebs, de bajo peso molecular. (Tabla I). [3].

Membrana interna:

Como se mencionó, contiene fundamentalmente dos componentes en común con la membrana externa; una proteína de alto peso molecular y un lípido, ambos insolubles en agua. [2].

En contraste con la membrana externa, la interna es intrínsecamente impermeable a casi todos los iones y moléculas polares, ya que es extremadamente rica en proteínas, (la relación lípido-proteínas es de 0.27:1.0), y un gran número de ellas funcionan como acarreadores. [1,5].

La membrana interna mitocondrial contiene una serie de pliegues internos o invaginaciones llamadas crestas, éstas varían en número y en estructura según el tipo de célula. [4]. Sobre las crestas se sitúan un gran número de enzimas involucradas en diversos aspectos metabólicos, contiene a la mayor parte de la actividad del sistema de la succinato deshidrogenasa, de la citocromo-oxidasa y de la ATP sintetasa, además contiene casi en su totalidad a las enzimas que forman parte de la cadena respiratoria. [3]. (Tabla I)

Espacio intramembranal:

El espacio intramembranal está ubicado entre la membrana interna y externa, éste tiene aproximadamente la misma composición iónica que el citosol [5] y sirve de comunicación entre las dos membranas, proporcionando a las enzimas que se hallan en éstas los catalizadores auxiliares conocidos como coenzimas. [3]. (Tabla I).

Matriz mitocondrial:

Consiste de una fase gelatinosa, que contiene aproximadamente el 50% de proteína mitocondrial, parte de la cual se halla organizada a un retículo ligado, según parece, a la superficie interna de la membrana interior. [4].

Contiene, al igual que las anteriores, diversas enzimas involucradas en diferentes procesos metabólicos tales como las enzimas responsables del ciclo-TCA, y de la oxidación de los ácidos grasos (Tabla I). La matriz también contiene varias cadenas de DNA circular, ribosomas y enzimas requeridas para la biosíntesis de proteínas, codificadas por el genoma mitocondrial.[5].

Tabla I. Localización de las enzimas mitocondriales, y coenzimas proteicos.

| Compartimiento | Enzimas. |
|-----------------------------------|---|
| Mitocondrial. | |
| 1. Membrana externa. | Monoamino-oxidasa. [4,5]. AcilcoenzimaA-sintetasa. [5]. Sistema de elongación de ácidos grasos. [5]. Glicerol fosfato acil transferasa. [5]. Colina fosfotransferasa. [5]. Fosfolipasa A. [4,5]. Nucleósido difosfocinasa. [5] NADH-deshidrogenasa. [4]. |
| 2. Espacio intramembranal. | Adenilato cinasa. [4,5]. Nucleósido difosfocinasa. [5] Sulfito-oxidasa. [5]. |
| 3. Membrana interna. | Citocromos b,c,c ₁ ,a,a ₃ . [5]. NADH-Deshidrogenasas. [5]. Succinato-Deshidrogenasa [5]. Ubiquinona. [5]. Flavoproteína transferidora de electrones. [5]. |

Tabla I. (continuación). Localización de las enzimas mitocondriales, y coenzimas proteicos.

| Compartimiento | Enzimas. |
|----------------|---|
| Mitocondrial. | ATPasa, F_0-F_1 - ATPsintetasa. |
| | [5]. |
| | B- Hidroxibutirato-Deshidro- -genasa. [5]. |
| | Carnitina -palmitiltransfe- -rasa. [5]. |
| | Sistema de elongación de ácidos grasos. [5]. |
| | Translocasa de ATP/ADP. [5]. |
| | Translocasa de Fosfatos (P_i)/ OH^- . [5]. |
| | Translocasa de dicarboxilos. [5]. |
| | Translocasa de tricarboxilos. [5]. |
| | Translocasa de α -cetoglutarato. [5]. |
| | Translocasa de piruvato. [5]. |
| | Translocasa de glutamato- |

Tabla.I. (continuación). Localización de las enzimas mitocondriales y coenzimas proteicos.

| Compartimiento | Enzimas. |
|----------------|--|
| Mitocondrial. | |
| 4.Matriz. | aspartato. [5]. Piruvato- Deshidrogenasa. [5] Citrato-sintetasa. [4,5]. Aconitasa. [5]. Isocitrato-Deshidrogenasa. [4,5]. Fumarasa. [4,5]. α -Cetoglutarato-Deshidrogena- -sa. [5]. Malato-Deshidrogenasa. [4,5]. Sistema de oxidación de ácidos grasos. [4,5]. Fosfopiruvato-carboxilasa.[5] Glutamato-Deshidrogenasa. [4,5]. Aspartato y glutamato amino- -transferasa. [4,5]. Ornitina transcarbamilasa.[5] Carbamilsfosfatosintetasa I. [5]. |

Dentro de todos los procesos metabólicos llevados a cabo por este organelo quizá el de mayor importancia es la oxidación de sustratos vía ciclo- TCA, acoplado a la cadena respiratoria, y fosforilación-oxidativa. (figura.2).

Cadena respiratoria:

La cadena respiratoria puede definirse como una secuencia lineal de acarreadores de electrones con tres regiones separadas donde la energía redox puede ser conservada en la síntesis de ATP [6]; ésta consiste de un ensamblaje de más de veinte acarreadores de electrones, junto con un número inespecífico de péptidos estructurales.[6].

Como se mencionó, la cadena respiratoria está compuesta de diversos tipos de moléculas que se han dividido en dos grandes grupos: El primero se ha nombrado como grupo de componentes de tipo no citocrómico, y el segundo, como el grupo de componentes de tipo citocrómico. [3].

Componentes no-citocrómicos:

A su vez se subdivide en los siguientes subgrupos:
a. Deshidrogenasas:

1. Nicotín adenín dinucleótido (NAD^+), y los nicotín amida adenín dinucleótido fosfato ($NADP^+$), constan de un dinucleótido que contiene una molécula de

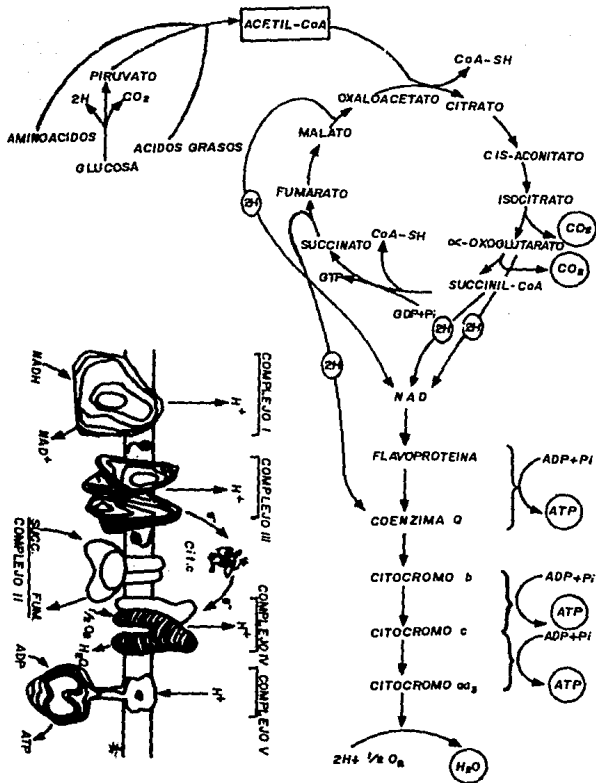
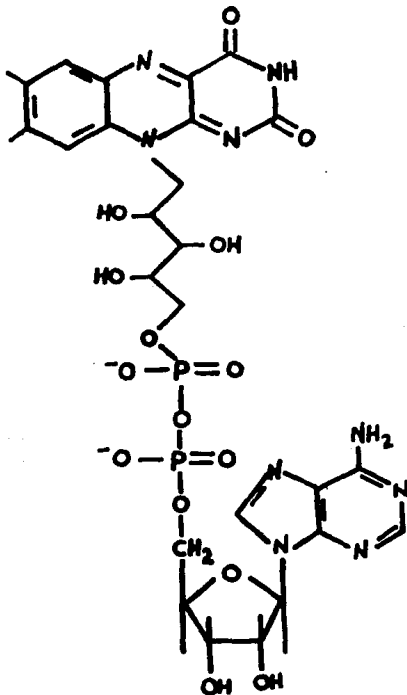


Figura 2. Representación esquemática (panel derecho) y tridimensional (panel izquierdo) del proceso de fosforilación oxidativa y oxidación de sustratos via ciclo-tca.

nicotín amida y adenina con dos moléculas de fosfato.[3].

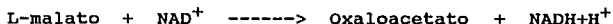
Su estructura general es la siguiente:



Las formas funcionales son las β -glicosiladas; la reducción enzimática ocurre en posición 4 del anillo de nicotín amida. Las formas oxidadas tienen una absorción máxima en 260nm, y 330nm, y las reducidas en 460nm. [3].

2. Proteínas específicas:

i. Malato-Deshidrogenasa: Cataliza la siguiente reacción:



Tiene como inhibidor natural al oxaloacetato, esta inhibición es de tipo irreversible, aunque algunos autores mencionan que es de tipo mixto, competitiva y no competitiva. [3].

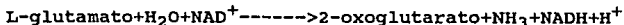
Actualmente existen tres isoenzimas activas:

*Isoenzima A. Dímero con dos subunidades X .

*Isoenzima B. Híbrido dimérico con una subunidad X, y una Y.

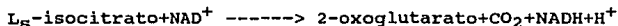
*Isoenzima C. Dímero con dos subunidades Y. [3].

ii. Glutamato-Deshidrogenasa: Cataliza la siguiente reacción:



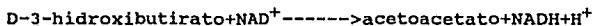
Entre los inhibidores de esta enzima se encuentran el GTP, (que es el más poderoso), GDP, y ATP; mientras que el ADP la activa. La coenzima reducida (NADH) también inhibe, pero su eficacia se incrementa en presencia de GTP o GDP. Su monómero activo puede constituirse de seis a ocho subunidades. [3].

iii. L_5 -Isocitrato-Deshidrogenasa: La reacción catalizada por esta enzima es la siguiente.



Existe una enzima de tipo citoplásmico con especificidad para NADP^+ , y una mitocondrial con especificidad para NAD^+ ; que se activan con Mn^{2+} y Mg^{2+} respectivamente. Se activa por ADP, por elevación de las concentraciones de isocitrato y de NAD^+ . Se inhibe por NADH y por ATP de forma competitiva, e incrementando las concentraciones de Mn^{2+} . [3].

iv.3-Hidroxibutirato-Deshidrogenasa: Cataliza la siguiente reacción:



Posee como coenzima al NAD^+ , se inhibe de forma competitiva con elevadas concentraciones de propanol y benzimidazol. [3].

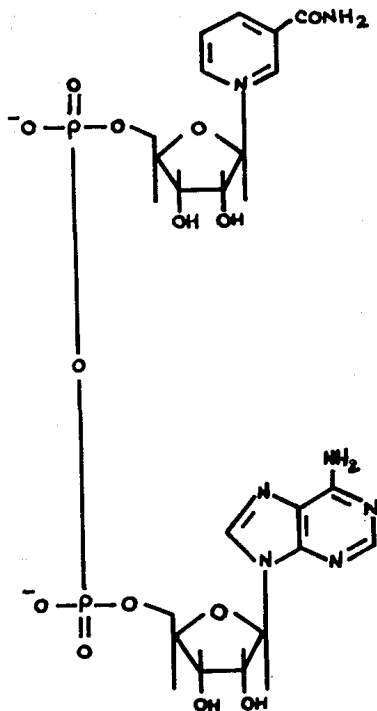
3.NAD(P) Transhidrogenasas: Se encargan de catalizar la siguiente reacción:



No es sensible a inhibidores excepto a p-cloro-mercuribenzoato a elevadas concentraciones ($> 4.5\text{mM}$), se activa por Mg^{2+} y ATP.

b. Flavoproteínas:

1. Flavín mononucleótido (FMN) y flavín adenín dinucleótido (FAD): Su estructura general es la siguiente:



Las dos propiedades de ambas coenzimas que revisten especial atención es la absorción de luz y fluorescencia; el espectro de emisión muestra un máximo en 264, 375, y 450nm. La absorbencia máxima es en

450nm.[3].

2.Enzimas específicas:

i.Succinato-Deshidrogenasa: Cataliza la siguiente reacción:



Se encuentra formando parte de lo que se conoce como complejo II mitocondrial y transfiere electrones del succinato. Este complejo consiste de cuatro polipéptidos, el más grande de los cuáles corresponde a la succinato-deshidrogenasa ; el complejo II contiene a el citocromo-b ; la enzima principal (succinato-deshidrogenasa) también contiene hierro, pero no ligado a un grupo hemo, y grupos sulfuro en su sitio activo; es por ello que es sensible a inhibición por p-cloromercuribenzoato. Se inhibe de forma competitiva por D-clorosuccinato, y D-metilsuccinato así como también por malonato. Tiene una K_m para su sustrato de $2.5 \cdot 10^{-4}$ - $5.3 \cdot 10^{-4}$ M. [3,6].

ii.NADH-Ubiquinona-óxidoreductasa: Se encarga de catalizar la siguiente reacción:



Este se ha denominado como complejo I mitocondrial. Tiene un pM de aproximadamente 850,000 Da, por lo que es un complejo enzimático muy grande y puede aceptar un solo electrón para formar un intermediario semiquinoide. Posee diversos grupos Fe-S

que funcionan como transferidores de electrones. [1,6,59].

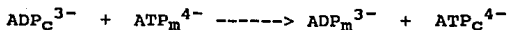
Los electrones del NADH entran a la cadena a este nivel transfiriéndolos a su grupo prostético (FMN) y éste, a su vez, los transfiere a los sitios Fe-S de la enzima, los cuales son transferidos a la coenzima Q o ubiquinona; que se reduce a ubiquinol por la adquisición de estos dos electrones. La coenzima Q al ser altamente no polar, difunde a través de la parte hidrocarbonada de la membrana interna mitocondrial participando como acarreador móvil de electrones que une a los complejos I, y II con el III mediante el "ciclo Q". [1,6].

c. Acarreadores y ATP-sintetasa:

1. Acarreadores:

i. Acarreador de ATP/ADP: El ATP o ADP no difunden libremente a través de la membrana interna mitocondrial. Necesitan de una proteína transportadora, que se ha denominado como acarreador de ATP/ADP, translocasa de ATP/ADP, o translocasa de adenín nucleótidos. [1].

Los flujos de ATP y ADP están acoplados de tal forma que el ADP ingresa a la matriz mitocondrial solamente si el ATP existe, y viceversa. La reacción catalizada por el acarreador es la siguiente [1,6]:



La estequiometría del intercambio es 1:1. La translocasa es un dímero de idénticas subunidades de 30KDa, y contiene un solo sitio de unión de nucleótidos con caras alternativas para la matriz y el citosol de la mitocondria. El ATP y ADP son unidos con la misma afinidad. [1,6].

El acarreador puede existir en dos estados, los cuales difieren en la orientación de su único sitio para unión a nucleótidos: El estado C_1 , en el cual el sitio de unión es accesible desde el citosol; y el estado M, en el cuál su sitio catalítico se encuentra accesible en la matriz mitocondrial.[6].

La translocasa es abundante, constituyendo aproximadamente el 14% de la proteína membranal. [1].

ii. Acarreador de Fosfatos (P_i): Cataliza el transporte electroneutro de $H_2PO_4^-$ por OH^- o por un *symport* de un H^+ , los dos indistinguibles [6].

2. ATP-sintetasa: Contiene nueve polipéptidos diferentes, varios de los cuales son presentados en múltiples copias, el complejo puede ser considerado en dos mitades: La parte que constituye el sitio catalítico de la síntesis de ATP, denominado como F_1 en mitocondrias; el resto son proteínas hidrofóbicas que tienen a su cargo conducir protones a través de las dos caras de la membrana, esta porción es denominada como F_0 [1,6].

F_1 posee un pM de 320KDa, y puede ser disociada en varias subunidades que son: α , β , γ , δ , y ϵ . La subunidad β se asume que pueda ser el sitio catalítico de la enzima y la δ parece requerirse para mantener unidas a F_0 y F_1 . Hay un inhibidor natural de la sintetasa que previene de que el ATP sea hidrolizado. [1,6].

Componentes citocrómicos:

a. Citocromo b:

La reacción catalizada por este citocromo es la siguiente [1]:



Este citocromo se encuentra cercano a las deshidrogenasas y participa directamente en la oxidación de NADH. Tiene un papel fundamental de acarreador y transferidor de electrones, participa en la reducción del citocromo c. [3].

Otra de sus funciones es la de catalizar la transferencia de electrones del ubiquinol a el citocromo c_1 , para ello el citocromo b contiene dos grupos hemo idénticos con diferentes afinidades para electrones, uno de ellos es llamado b-566, y el otro b-562 [1].

El citocromo b se encuentra formando parte (en trazas) de un complejo mitocondrial denominado como complejo II o complejo succinato-ubiquinol-oxidoreductasa, y del complejo III; este componente tiene un máximo de absorción en 526nm. [3,6,59].

b.Citocromo c:

Su función es la de reducir a la citocromo oxidasa, tiene como grupo prostético al hemo; este citocromo c se puede resolver en dos tipos de citocromos, el c y el c_1 . [6].

El citocromo- c_1 es una proteína integral del complejo III, mientras que el c es una proteína periférica sobre la cara c de la membrana y une a el complejo III con la citocromo-oxidasa. [6]. El homopéptido tiene una emisión máxima en estado reducido a 415, 521, y 550nm. En su espectro de absorción los picos máximos son de 418, 524 y 554nm. [3].

El citocromo-c se encuentra formando parte de lo que se ha denominado complejo III mitocondrial, junto con los citocromos-b y una sola proteína Fe-S electropositiva; se cree que el citocromo- c_1 contenga una proteína de tipo estructural, ya que se inactiva por tripsina. [6].

c.Citocromo-oxidasa:

Su función es la de oxidar el citocromo c, con la consecuente reducción del oxígeno molecular a agua, y

bombear protones de la matriz mitocondrial al lado citosólico; la reacción que cataliza es la siguiente. [1,3,6,59]:



Está formada de los citocromos a y a₃, por lo que también se denomina como citocromo aa₃. [1,3,6].

También está integrada por un grupo hemo y un grupo de porfirina. Los hemo se dividen en hemo-a_α, y hemo-a_β, los cuales muestran marcadas diferencias y se unen a otra proteína por medio de átomos de cobre. [1,3].

El ferrocitocromo-c dona sus electrones a el hemo-a_α y entonces uno de ellos es transferido a el hemo-a_β para que el oxígeno molecular se reduzca en una serie de pasos hasta dar dos moléculas de agua. [1].

La enzima tiene un espectro de absorción con un máximo en 279nm. [3].

Inhibidores de cadena respiratoria:

La caracterización completa de la cadena respiratoria y de otras rutas en gran medida se ha podido realizar mediante el empleo de diversos inhibidores metabólicos de diferentes tipos, así, de los inhibidores clásicos de cadena respiratoria se tienen los siguientes:

1. Antimicina A: Existen fundamentalmente cuatro tipos, los más utilizados son: La antimicina A₁ y la

antimicina A₃, las cuales se distinguen por poseer un radical (grupo R) n-hexil y n-butil respectivamente [3].

Este inhibidor actúa específicamente entre los citocromos-b y c₁, incrementando la reducción del citocromo-b y bloqueando la reducción del citocromo-c₁, previniendo de la bomba de H⁺ del sitio II, y tiene una inhibición media máxima a la concentración de 5*10⁻⁸M en mitocondrias de corazón. Se clasifica dentro del grupo de inhibidores irreversibles.[1,3,6].

2.Cianuro: Este inhibidor es quizá de los más clásicos para el sistema de la citocromo oxidasa, que es donde se localiza su sitio de acción específico, muestra una K_{0.5} de 5*10⁻⁷M en mitocondrias de corazón. Se describen dos sitios de unión para el cianuro a nivel de la oxidasa, presentando una inhibición de tipo no competitiva.[3].

3.Rotenona: Su inhibición es de tipo irreversible y específica, ésta actúa a nivel de los grupos hemo sin hierro de la NADH-deshidrogenasa o sitio I [1,3].

4. Oligomicina: Corresponde a el tipo de inhibidores derivados de antibióticos, que bloquea de forma irreversible y específica la síntesis de ATP por interferir con la utilización del gradiente de H⁺ [1,6].

5. Carboxiatractilósido: Es un glucósido de plantas, que se une específicamente a la translocasa de forma irreversible cuando tiene el sitio de unión de nucleótidos fuera de la membrana interna mitocondrial (estado C_1), la fosforilación oxidativa se detiene rápidamente después de su inhibición mostrando que la translocasa es esencial [1].

6. Mersalil: Es un agente mercurial que tiene la capacidad de inhibir específicamente a el acarreador de fosfatos. [6].

Los procesos de cadena respiratoria, síntesis de ATP y oxidación de sustratos, como fenómenos aislados carecerían de significado fisiológico y muchos de ellos no podrían llevarse a cabo. Debido a ello, estos procesos se integran o acoplan en un tercero denominado como fosforilación oxidativa.

Existen diversas teorías que tratan de explicar como es que se lleva a cabo el acoplamiento entre estos sistemas, pero sin duda alguna, de todas ellas la que más aceptación ha tenido es una teoría propuesta por Peter Mitchell en 1961 denominada como Hipótesis Quimiosmótica. [1,6].

Hipótesis Quimiosmótica:

El dogma central de la hipótesis quimiosmótica propone que el transporte de electrones y la síntesis de ATP están acoplados por un potencial electroquímico

de H^+ ($\Delta \mu_{H^+}$) a través de la membrana interna mitocondrial por un intermediario covalente de alta energía, o una conformación proteica activada. [1,6].

En este modelo la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria y la síntesis de ATP están catalizadas por bombas de H^+ separadas y reversibles desde la matriz hasta el otro lado de la membrana interna mitocondrial. La concentración de H^+ empieza a ser más elevada en el lado citosólico y un potencial eléctrico ($\Delta\phi$) es generado. [1,6].

Mitchell postuló que la fuerza motora de H^+ maneja la síntesis de ATP por el complejo ATPasa. (fig.3). En esencia el evento primario conservador de energía en este modelo es el movimiento de H^+ a través de la membrana interna mitocondrial.[1].

La hipótesis quimiosmótica también incluye un postulado para la existencia de sistemas de transporte en los cuales los metabolitos son transportados como especies neutras, junto con H^+ , o en intercambio con OH^- . [6].

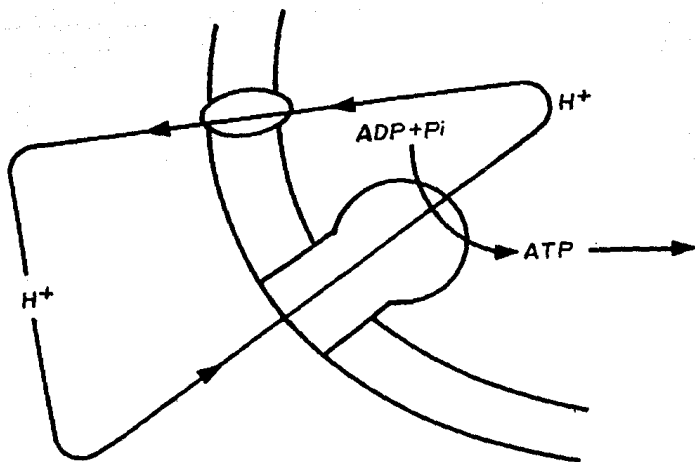


Fig.3. Acoplamiento electroquímico de protones. El ATP es continuamente removido por el consumo de ATP citosólico, mientras $\Delta\mu_{H^+}$ es continuamente reemplazado por la cadena respiratoria.

Transporte de calcio mitocondrial:

Otro de los procesos que se llevan a cabo en la mitocondria, y que ha adquirido la atención de un gran número de investigadores es el transporte de calcio mitocondrial. (figura.4).

El fenómeno de transporte de calcio se cree que es vital para el buen funcionamiento de el metabolismo mitocondrial y celular, ya que el calcio puede modular diversas actividades de ciertas enzimas claves para el metabolismo intermediario; aun más, este catión puede verse involucrado en el mecanismo de transducción de señal funcionando como segundo mensajero, liberado por reservorios intracelulares de calcio como son la mitocondria y el retículo sarcoplásmico; además de jugar un papel muy importante en la contracción muscular, y de estar acoplado a el circuito quimiosmótico de H^+ ya que cada ciclo completo del Ca^{2+} involucra la entrada de nH^+ .

I. Interrelación entre el transporte de Ca^{2+} y de H^+ :

El potencial de membrana ($\Delta\phi$), componente del potencial electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$), fluctua entre 150-180mv, y puede servir para acumular Ca^{2+} por un unyport hasta un máximo de 100-150nmol/mgp (con una concentración de Ca^{2+} libre en la matriz de 6.4-16.3nmol/mgp), esta cantidad puede ser incrementada en presencia de aniones permeantes que penetran a la

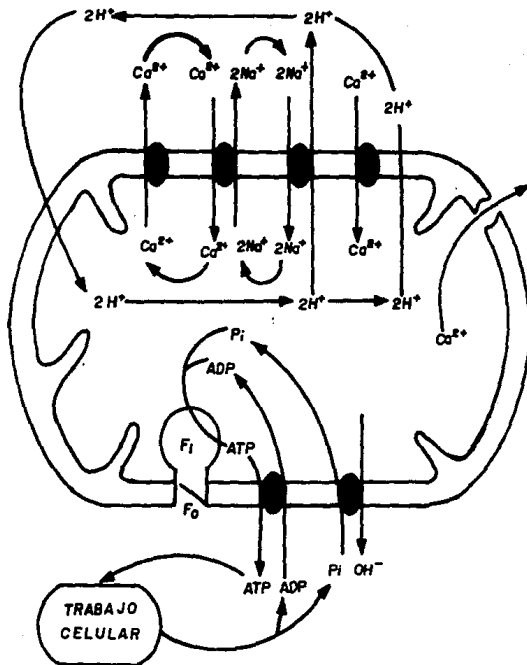


Figura 4. Algunos eventos que ocurren en el transporte de Ca^{2+} mitocondrial. En la figura se muestran las rutas de influjo y eflujo de Ca^{2+} , así como el proceso de fosforilación.

mitocondria para precipitar Ca^{2+} como sal insoluble [7,10,14].

La fuerza motora actual para la acumulación de Ca^{2+} es el potencial electroquímico de Ca^{2+} ($\Delta \mu_{\text{Ca}^{2+}}$). [7].

La captación de Ca^{2+} es reversible y requiere de la generación del $\Delta \phi$ por expulsión de H^+ ligados a la respiración o hidrólisis de ATP [9,10], por esta razón, una limitante para la acumulación de Ca^{2+} se debe a la alcalinización de la matriz; la capacidad de regular el pH por la matriz es aproximadamente 20nm de H^+ /unidad de pH * mg de proteína (mgp), obteniéndose un ΔpH de 2 unidades disminuyendo el $\Delta \phi$ a 120mv. [7].

Por cada Ca^{2+} acumulado existe la salida neta de dos H^+ . [34]. Se ha asumido que la captación de Ca^{2+} es de inherente prioridad sobre la fosforilación de ADP. Puesto que la reacción catalizada por la ATP-sintetasa es reversible, la disminución transitoria del $\Delta \mu_{\text{H}^+}$, durante la captación de Ca^{2+} , puede ser prevenido por la síntesis de ATP pero puede resultar en una rápida hidrólisis de la matriz. [7].

Los H^+ arrojados por la actividad ATPasa deben ser adicionados a los H^+ sacados por la cadena respiratoria, para dar un balance de movimiento de iones, entonces una aparente "superestequiometría" es mostrada. [7].

II. El unyporter de Ca^{2+} :

a. Evidencia para un mecanismo mediado por un unyporter: La insensibilidad a oligomicina por parte de la respiración, que soporta la captación de Ca^{2+} , y la sensibilidad de la captación de Ca^{2+} dirigida por la hidrólisis de ATP para el inhibidor proveen de evidencia clásica para que el proceso dependa directamente del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$. [7,19].

La capacidad que poseen ciertos iones y policationes para inhibir el transporte de Ca^{2+} como Sr^{2+} , La^{3+} y RR, indican la presencia de un acarreador específico para Ca^{2+} [10].

En ausencia de aniones permeantes, dos H^+ aparecen en el medio por cada Ca^{2+} acumulado, pero no es definitivo para un mecanismo de $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$. Por otra parte, la estequiometría $\text{K}^+/0$, que es dos veces la estequiometría de la acumulación del Ca^{2+} , da un soporte para el modelo del unyporter $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$. [7].

b. Dependencia de la $[\text{Ca}^{2+}]$ externo: Existe una fuerte dependencia sigmoidal de Ca^{2+} sobre la actividad del unyporter, ya que la actividad del mismo es influenciada por la $[\text{Ca}^{2+}]$ externo ($[\text{Ca}^{2+}]_0$), pH, temperatura, $\Delta\phi$ e inhibidores. En la mayor parte de los estudios *in vitro*, el transporte de Ca^{2+} es unidireccional, y el Ca^{2+} interno ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) no parece regular al acarreador. [7,18].

Todas las técnicas han mostrado que la actividad del *unypor*ter es altamente dependiente del Ca^{2+} extramitocondrial y muestra una K_d para el complejo Ca^{2+} -*unypor*ter mayor de $50\mu\text{M}$ [14]. La mayor controversia es la K_m para el *unypor*ter; sin embargo, es dudoso si una constante de Michaelis tiene algún significado en el contexto de la captación de Ca^{2+} mitocondrial; primeramente porque la actividad del *unypor*ter es influenciada no solo por la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ sino también por la magnitud del potencial electroquímico del Ca^{2+} ($\Delta\mu_{\text{Ca}^{2+}}$); y segundo porque el *unypor*ter no tiene claramente definida una " V_{max} ". [7].

La cinética para el *unypor*ter es de tipo sigmoideo, y podría deberse a un mecanismo no reconocido de eflujo independiente. La sigmoidicidad, implica que la actividad del *unypor*ter se incrementa de forma directamente proporcional a la $[\text{Ca}^{2+}]_o$, pero en general el *unypor*ter carece de V_{max} y la saturación de la curva a elevadas concentraciones de Ca^{2+} es debida a otros pasos limitantes. A pesar de todo esto se reporta una K_m para el proceso de $5\mu\text{M}$ [7,12].

c. Dependencia del pH externo: Es aceptado que la actividad del *unypor*ter se incrementa con elevaciones del pH externo comprendidos en el rango de 7-8, aunque no es la única actividad afectada por el pH, ya que existen reportes de que el eflujo también se afecta y

muestra un pH óptimo de 7.0 [7,18].

En mitocondrias de corazón, una disminución del pH de 8 a 6.5 resulta en un gran incremento del eflujo dependiente de Na^+ sin afectar en mayor grado a el eflujo independiente del ión, por lo que éste último se reporta como insensible a el pH [23,24,54].

d. Dependencia de la temperatura: No es totalmente claro el efecto de la temperatura sobre el *unporter*, pero se ha observado que su activación disminuye incrementando la temperatura [7], y que la cinética cambia de hiperbólica a sigmoideal cuando esta disminuye de 30°C a 10°C [19].

Se ha observado que la ruta de eflujo es más sensible a cambios en la temperatura que la del *unporter* [18].

e. Dependencia sobre $\Delta\phi$: Los gradientes de Ca^{2+} son generados por potenciales de difusión, y se ha observado que cuando las velocidades de captación de Ca^{2+} son incrementadas por la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ existe una depresión del $\Delta\phi$ y a $[\text{Ca}^{2+}]_o$ elevadas el $\Delta\phi$ puede disminuir hasta llegar a ser menor de 100mv. El gradiente de concentración de Ca^{2+} y $\Delta\phi$ son cada uno componentes de todos los potenciales electroquímicos del Ca^{2+} . [18,19].

También se ha reportado que las cinéticas del *unporter* cambian cuando la mitocondria ha perdido

transitoriamente el $\Delta\phi$, lo cual apoya el hecho de que el influjo dependa directamente del $\Delta\phi$ [20].

f. Dependencia sobre el estado redox mitocondrial: En diversos estudios se ha observado que la reducción del NADP^+ puede ser ligada con una inhibición del eflujo de Ca^{2+} , lo cuál no ocurre con el NAD^+ , por lo que se ha sugerido que las reacciones dependientes de NADP^+ son parte de un mecanismo fisiológico regulador de la salida y retención de Ca^{2+} [42,44].

g. Inhibidores del *unypporter*: El rojo de rutenio (RR) es un complejo inorgánico hexavalente de rutenio, el cual fue el primero en introducirse como una glicoproteína histoquímica. Este inhibe al *unypporter* con un alto grado de especificidad sin disminuir el $\Delta\phi$ y es utilizado en concentraciones que fluctúan entre 2-5nmol/mgp [11,21].

La inhibición es de tipo no competitiva con una K_i de $3 \cdot 10^{-8}\text{M}$ [7,39]. Con concentraciones de RR que sobrepasan los 5nmol/mgp se puede inhibir el eflujo de Ca^{2+} dependiente de Na^+ [20].

Concentraciones elevadas de RR ($>10\text{nmol/mgp}$) pueden inhibir el estado 4 de la respiración mitocondrial, al igual que a la ATP-sintetasa, por lo que se le ha descrito un efecto dual que interfiere con el transporte de Ca^{2+} y con la respiración mitocondrial [40].

El *unporter* puede ser inhibido también por lantánidos, aunque éstos son menos específicos que el RR y también inhiben las rutas independientes y dependientes de Na^+ . La unión de 1pmol/mgp de La^{3+} es suficiente para inhibir a el *unporter* en mitocondrias de hígado y corazón [7,19].

La potencia de los lantánidos se incrementa cuando disminuye el radio atómico no hidratado del La^{3+} (1.15\AA) hasta el Tm^{3+} (0.95\AA). Son efectivos para mitocondrias de corazón en concentraciones que fluctúan entre $1\text{-}2\text{pmol/mgp}$ [19].

El Mg^{2+} puede inhibir la captación de Ca^{2+} compitiendo por la energía y sitios de unión mitocondriales, interfiriendo con la energía ligada a el transporte de Ca^{2+} e incrementando hasta tres veces la K_m para Ca^{2+} [12,15]. Su efecto se saturará a $[\text{Mg}^{2+}]$ que fluctúan entre $1\text{-}1.5\text{mM}$ libre, todo ello sin afectar las rutas de eflujo [21,41].

Por esta capacidad de inhibir el influjo de Ca^{2+} , y al encontrarse en concentraciones de 0.9mM *in vivo* se piensa que podría funcionar como regulador de la capacidad mitocondrial de remover Ca^{2+} citosólico [10].

La inhibición inducida por el Mg^{2+} se ha descrito como competitiva [23].

El Mg^{2+} puede tener un efecto protector sobre la fosforilación oxidativa mitocondrial durante la

acumulación de Ca^{2+} y alterar la respuesta de mitocondrias de corazón a la adición simultánea de Ca^{2+} y ADP por esto se piensa que el efecto protector del Mg^{2+} se ejerce a nivel de un estado intermediario de alta energía, de tal forma que no toda la energía generada por el transporte de electrones pueda ser dirigida exclusivamente a la captación de Ca^{2+} [41,44].

h. Ionóforos de Ca^{2+} : Uno de los principales ionóforos de Ca^{2+} es el A23187 el cuál, a bajas concentraciones, no ejerce efecto sobre la acumulación de Ca^{2+} ya que actúa como un canal en la membrana mitocondrial y solamente facilita el equilibrio del gradiente de Ca^{2+} en la mitocondria, y parece ser que el eflujo de Ca^{2+} causado por el ionóforo es compensado incrementando la captación de Ca^{2+} [9,41,54].

Este ionóforo produce una salida del 30%, pero al adicionarse junto con el RR puede sacar todo el Ca^{2+} intramitocondrial [41].

La valinomicina no tiene un efecto *per se* sobre los movimientos de Ca^{2+} , ya que solamente induce la salida de este ión en medios que contienen K^+ , por lo que su efecto sobre el transporte de Ca^{2+} se debe a una reducción en el $\Delta\phi$ [9].

La nigericina también puede causar eflujos de Ca^{2+} mitocondriales incrementando el $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ y disminuyendo el pH [9].

III. La naturaleza del unyporter:

La dificultad de saturación del unyporter por Ca^{2+} , la relativamente baja especificidad para cationes, el elevado número de recambio deducido del pequeño número de sitios de unión a La^{3+} y el bajo coeficiente de temperatura, todos favorecen el mecanismo de un canal, particularmente por que la actividad es retenida a temperaturas bajo cero cuando, si fuese un mecanismo convencional de acarreador móvil, se esperaría que fuese inmovilizado. [7].

La habilidad de la glicoproteína para unirse al RR e inhibir la captación de Ca^{2+} , ha promovido la investigación acerca del papel de las glicoproteínas sobre el transporte de Ca^{2+} ; de tal forma que se han realizado diversos intentos para aislar y purificar al unyporter . [7].

En 1972 se aisló un factor soluble por los Doctores Puyou y Lehninger [7,8] capaz de unir Ca^{2+} con alta afinidad. Este factor fue obtenido a partir de extractos acuosos de mitocondrias de hígado. Contenía una proteína con pM de 67KDa y la unión del Ca^{2+} a esta proteína podía inhibirse con La^{3+} y RR, pero no por inhibidores respiratorios o desacoplantes [8].

Carafoli, Sottocasa y cols., aislan otra proteína que posee la capacidad de unir Ca^{2+} a sitios de alta y baja afinidad, esta proteína se encuentra presente en

membranas mitocondriales y/o espacio intramembranal pero no en la matriz, y parece corresponder a un acarreador móvil o inmóvil específico para recibir Ca^{2+} . Esta proteína muestra ser muy semejante a la aislada por los Dres. Puyou y Lehninger [10].

IV. Mecanismos de eflujo de Ca^{2+} :

Actualmente se han descrito fundamentalmente tres mecanismos de eflujo de Ca^{2+} , que operan en condiciones fisiológicas y podrían jugar un papel fundamental en la regulación de la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial, y posiblemente pudiese existir un cuarto mecanismo del cual se tiene poca evidencia.

El primero de ellos consta de un intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, el segundo de un intercambio $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ y el tercero de un poro de salida de Ca^{2+} sensible a ciclosporina (fig.4) [7,19].

a. Rutas dependientes de Na^+ : Las rutas de eflujo en mitocondrias de tejidos excitables como corazón, músculo esquelético, cerebro, glándula parótida, corteza adrenal, y tejido adiposo café son todas fuertemente activadas por la adición de Na^+ con una activación media máxima a concentraciones entre 6-8mM de Na^+ externo, el efecto se reporta como no saturable [12,16,25], y muestra diferentes actividades dependiendo del tejido y especie al cual pertenezcan las mitocondrias, de tal forma se han llegado a

establecer las diferentes actividades de los *antypoters* $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en diferentes especies y tejidos [31,38]:

| Tejido | Actividad a 20°C (nmol de $\text{Ca}^{2+}/\text{min}\cdot\text{mgp}$) |
|--------------------------------|---|
| Corteza adrenal de bovino | 11 |
| Corazón de rata | 9 |
| Cerebro de rata | 8 |
| Tejido adiposo café de hamster | 5 |
| Músculo esquelético de conejo | 3 |
| Glándula parótida de bovino | 3 |
| Tejido adiposo café de conejo | 3 |
| Músculo esquelético de pato | 2-3 |
| Corteza renal de rata | 1 |
| Pulmón de rata | 1 |
| Hígado de rata | 1 |

Los *antypoters* $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ catalizan el eflujo de Ca^{2+} dirigido por la combinación de un $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ y un $\Delta\mu_{\text{Ca}^{2+}}$ para formar un $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ y $\Delta\mu_{\text{Ca}^{2+}}$ [23].

Algunos estudios muestran que la velocidad de salida de Ca^{2+} es proporcional a la cantidad de Na^+ que

ingresa a la mitocondria [10]. Cuando el RR es añadido a éstas después de la acumulación de Ca^{2+} (en un medio libre de Na^+) solamente se observa un pequeño eflujo y la salida total de Ca^{2+} dependiente de Na^+ solo es completa si esta presente el RR [25]. El mantenimiento de un $\Delta\phi$ elevado y el que la velocidad de respiración sea más rápida en ausencia de RR demuestran que cada eflujo debe ocurrir por un mecanismo diferente al del *unporter*. [7,19].

La ruta de eflujo en corazón ha sido muy estudiada, y así se ha establecido que posee un coeficiente de Hill de 2, lo que sugiere que la ruta es electroneutra al final implicando posiblemente una estequiometría de $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ la cuál es difícil de medir por la operación rápida de un *antporter* Na^+/H^+ [12,21]. La estequiometría de $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ para este eflujo fue demostrada en 1980 por Affolter y cols [26].

Este eflujo esta mediado por un *antporter* específico y posee una velocidad máxima de salida de Ca^{2+} de 0.25nmol de $\text{Ca}^{2+}/\text{s}\cdot\text{mgp}$. en mitocondrias de corazón [11,12].

El eflujo de Ca^{2+} puede ser inhibido significativamente (pero no totalmente) por concentraciones de 7-15 μM de Ca^{2+} externo. Por lo anterior se cree que en corazón puedan existir dos tipos de mitocondrias unas con un *antporter* sensible a

Ca^{2+} externo y otras insensibles a él. Esta inhibición parcial conlleva a una disminución del 70% en el valor de V_{\max} para el *antporter* por lo que el Ca^{2+} externo podría ser un inhibidor parcial, no competitivo con respecto a el Na^+ [28,48].

Las cinéticas del *antporter* sugieren que el Na^+ y el Ca^{2+} deben ser unidos a él simultáneamente para que se lleve a cabo el eflujo [21].

En la célula viviente la actividad del *antporter* $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ depende de [23]:

- i. Las concentraciones de Ca^{2+} citosólico.
- ii. La presencia y concentración de efectores positivos o negativos.
- iii. La concentración de Ca^{2+} libre en la matriz.

La concentración intracelular de Na^+ libre es menor a 0.2mM y varría de acuerdo a el potencial de acción cardíaco [23,35].

Recientemente se reportó que los gradientes de Na^+ mantenidos a través de la membrana mitocondrial son dependientes del $\Delta p\text{H}$ y del intercambiador Na^+/H^+ endógeno [35].

El K^+ no puede reemplazar a el Na^+ en el eflujo inducido en presencia de RR, y esto probablemente se deba a que existe una baja actividad del intercambiador K^+/H^+ en la membrana interna de estas mitocondrias [7]; aunque el Li^+ si puede reemplazar a el Na^+ pero con

menor eficiencia (aproximadamente del 70% con respecto al Na^+) [19,23].

Aunque el K^+ no puede reemplazar a el Na^+ si puede incrementar las velocidades de eflujo, la activación se describe como alostérica con respecto a el *antypporter* $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [23].

La estimulación por K^+ es de el 240% con una concentración final de K^+ de 15mM, esta activación podría ser un fenómeno saturable con una K_m de 17-19mM [27].

El K^+ causa un pequeño incremento en la V_{max} y a concentraciones de 120mM mejora la potencia inhibitoria del Ca^{2+} externo [28].

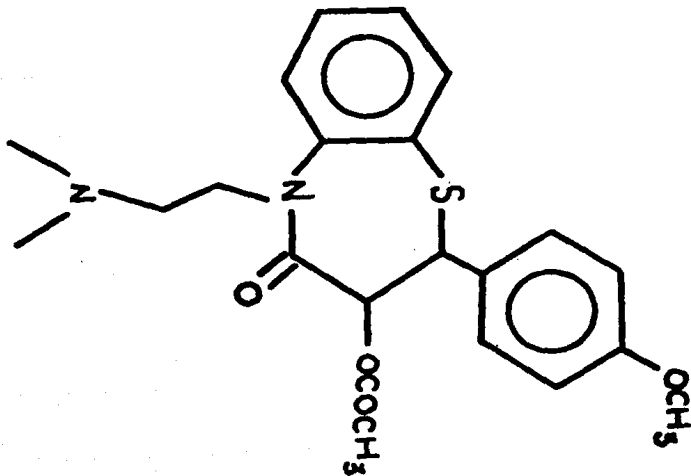
Se ha propuesto un mecanismo de intercambio $\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$, el cual puede funcionar en ausencia de Na^+ por la acción combinada del *antypporter* Na^+/H^+ con los *antypporters* $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ o Na^+/H^+ (fig.4), pero al momento de agregar Na^+ este intercambio se inhibe dando lugar al intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [12].

El pequeño eflujo observado en mitocondrias de corazón en ausencia de Na^+ podría deberse a una ruta de eflujo independiente de Na^+ . Esta muestra baja sensibilidad a lantánidos [7], por lo que probablemente se pueda involucrar un eflujo $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$.

b. Inhibidores del *antypporter* $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$: Se ha reportado una acción selectiva de un gran número de

drogas capaces de inhibir a el *antyporter* $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en mitocondrias de cerebro y corazón. Los probados han sido: Diltiazem, diazepam, prenilamina, y nifedipina como la más potente. En mitocondrias de hígado la prenilamina mostró una alta selectividad para el *antyporter* $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sobre el sistema independiente de Na^+ [19].

La titulación del eflujo de Ca^{2+} con diltiazem en mitocondrias de corazón muestra una gran sensibilidad del eflujo dependiente de Na^+ y una pequeña sensibilidad en el eflujo independiente de este ión, la K_i de diltiazem para el primer proceso es de $5\mu\text{M}$, y concentraciones mayores de 1mM resultan en una depresión del eflujo independiente de Na^+ . La estructura del diltiazem es la siguiente [23,45]:



Estructura del diltiazem (cis-(+)-3-(acetiloxi)-5-[2-(dimetilamino) etil]-2,3-dihidro-2-(4-metoxi-fenil)-1,5-benzotiazepina-4-(5H)-ona).

El diltiazem no influencia la captación de Ca^{2+} y su isómero l-cis es mucho menos efectivo para producir la inhibición. El fármaco en concentraciones mayores de $320\mu\text{M}$ inhibe la captación de Ca^{2+} y la fosforilación oxidativa [45,46].

Se ha descrito que el diltiazem también es un excelente antagonista para canales de Ca^{2+} , y ejerce sus efectos de manera independiente de la concentración de Ca^{2+} externo [46].

El tetrafenilfosfonio (TPP) y análogos son potentes inhibidores del eflujo dependiente de Na^+ . El 50% de la inhibición ocurre a concentraciones de TPP superiores a $3\mu\text{M}$, y puede llegar a inhibir aunque en otras concentraciones a el eflujo de Ca^{2+} independiente de Na^+ . El tipo de inhibición es una mezcla entre competitiva y no competitiva, predominando esta última. La K_i para la inhibición es de $0.2\mu\text{M}$ [21].

La colina puede inhibir el eflujo de Ca^{2+} dependiente de Na^+ ; la inhibición se describe como alostérica [23].

c.Rutas independientes de Na^+ : El RR induce un eflujo neto de Ca^{2+} en mitocondrias de hígado, riñón y pulmón en ausencia de Na^+ . Y existe controversia acerca

de que esta salida de Ca^{2+} se deba directamente a la salida de uno o más protones, ya que podría actuar un *symporter* Ca^{2+} /Fosfato (P_i) junto con el *antporter* P_i/OH^- [7].

Evidencia circunstancial para un *antporter* $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^+$ proviene de la observación que la inducción de gradientes transitorios de pH a través de la membrana interna por la adición de ácidos que pueden afectar la acumulación de Ca^{2+} por la mitocondria de una manera insensible a RR durante y no de la respiración. La evidencia más fuerte de que el eflujo en hígado no tiene un requerimiento obligado de P_i es la observación de que la velocidad de eflujo inducida por RR en mitocondrias de hígado es verdaderamente más rápida cuando las mitocondrias han sido extensamente depletadas de P_i [7,43,54].

Un eflujo paralelo pero independiente podría predecirse por eso; un eflujo neto de Ca^{2+} podría requerir la disociación del complejo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ de la matriz, provocando un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ junto con la acidificación de ésta, resultando en un eflujo de Ca^{2+} que se intercambia por H^+ [7].

En 1990 Rottenberg y Marbach demuestran la existencia y estequiometría del intercambio de Ca^{2+} independiente de Na^+ ; sus evidencias son claras y entre las más importantes se encuentran el que la velocidad

de eflujo de Ca^{2+} dependa sobre la magnitud del ΔpH la cuál es fuerte a elevados ΔpH donde $2\Delta\text{pH} \gg \Delta\text{pCa}$. A bajos valores de $2\Delta\text{pH}$, donde ΔpH es semejante a ΔpCa , la dependencia es moderada. Esta evidencia soporta fuertemente la noción de que : (a) El sistema de eflujo independiente de Na^+ existe y (b) El proceso es catalizado por un acarreador de intercambio electroneutro $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ [34].

d. Poro de salida de Ca^{2+} sensible a ciclosporina: El descubrimiento de este tercer mecanismo es reciente, por ello la caracterización del mismo no es totalmente completa.

Este mecanismo se empezó a evidenciar por estudios realizados con etanol (et-OH) sobre el transporte de Ca^{2+} mitocondrial, en donde se observaba una pérdida de Ca^{2+} intramitocondrial y una disminución en la capacidad de transportar y acumular Ca^{2+} por mitocondrias de ratas alcohólicas [29,69,130].

Otras evidencias que apoyan el mecanismo del poro provienen de la observación de que grandes cantidades de Ca^{2+} causan un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, pero hasta ahora no es claro si la salida de Ca^{2+} se deba a la activación del poro o a una salida mediada por lípidos [34,68,69].

Recientemente se ha encontrado que la droga inmunosupresora ciclosporina A (cic-A) es un potente

inhibidor de este poro de salida de Ca^{2+} . El poro de salida de Ca^{2+} también muestra sensibilidad a ADP y Mg^{2+} , además, el proceso parece estar interrelacionado con la PLA_2 [34,37,67,68].

En 1991 Rottenberg y Marbach reportan una inhibición del eflujo de Ca^{2+} independiente de Na^+ por et-OH mientras el dependiente del ión sufría una estimulación de más de 10 veces, y concluyen que el eflujo de Ca^{2+} independiente de Na^+ es parcialmente debido a la activación de un poro no específico sensible a ciclosporina [36].

El intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es estimulado a concentraciones relativamente bajas de et-OH y su efecto se satura con 0.2M, por lo que es claro un efecto específico del et-OH sobre el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ más que un efecto del mismo sobre el poro sensible a ciclosporina [36].

El et-OH no afecta la K_m para Na^+ , por lo que tampoco afecta la interacción del Na^+ con su respectivo *antporter*, y el efecto no parece modificarse en presencia de espermina y es posible que el et-OH inhiba específicamente la activación de la PLA_2 para la formación del poro [36].

e. Un posible cuarto mecanismo de salida de Ca^{2+} : Existen reportados una serie de estudios que involucran un mecanismo de eflujo de Ca^{2+} que promueve un

incremento inespecífico en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, el cual se encuentra estrechamente relacionado con el mecanismo que involucra la formación del poro de salida de Ca^{2+} sensible a ciclosporina.

En 1985 Broekemeir y cols., reportan una salida inespecífica de Ca^{2+} producida aparentemente por oxaloacetato, palmitoilCoA, P_i , hidroperóxidos, reactivos sulfidrilo e inhibidores de la glutatión reductasa mitocondrial. Esta salida era acompañada por un incremento inespecífico de la permeabilidad en la membrana interna mitocondrial [30].

En esa misma investigación se llega a la conclusión de que la activación de la PLA_2 dependiente de Ca^{2+} se encuentra involucrada en el efecto, y que el efecto no se observaba en presencia de N-oleoiletanolamida, trifluoroperazina y diltiazem entre otros [30].

En 1989 el grupo de Rustenbeck y Lenzen observan que los ácidos grasos y en especial el araquidónico tienen cierto efecto sobre el transporte de Ca^{2+} mitocondrial. En sus experimentos observan que este ácido puede inhibir a el *unypporter* e inducir la salida de Ca^{2+} intramitocondrial, además, que esta salida se incrementaba al adicionar Na^+ o RR a el medio y que la espermina no podía revertir el efecto el cual se

acompaña con una disminución en el $\Delta\phi$ por inhibición de la conductancia transmembranal del K^+ [32].

Ellos observan que el efecto excluye a los ácidos trans-no saturados y que los ácidos grasos más efectivos son los cis-no saturados, mostrando una inhibición media máxima del influjo de Ca^{2+} con concentraciones menores de $100\mu M$ [32].

Este fenómeno de salida de Ca^{2+} también involucra a la PLA_2 debido a que la enzima puede producir una mezcla de ácidos grasos activos e inactivos que afectan a el transporte de Ca^{2+} mitocondrial [32].

El fenómeno también incluye a los lisofosfolípidos con el siguiente orden de potencia: Lisofosfatidícolina = lisofosfatidílglicerol > lisofosfatidílinositol > lisofosfatidíl serina >> lisofosfatidíletanolamina, lo cuál indica que cambios en el transporte de Ca^{2+} inducidos por lisofosfolípidos son mediados por la interacción de estos con la membrana mitocondrial mediante la activación de la PLA_2 y fosfolipasa C [33].

Los lisofosfolípidos también disminuyeron el $\Delta\phi$ con el mismo orden de potencia lo cual podría ser la causa del eflujo de Ca^{2+} inducido por estas moléculas [33].

f. El eflujo disminuye el potencial electroquímico del Ca^{2+} ($\Delta\mu_{Ca^{2+}}$): La fuerza motora para la captación

de Ca^{2+} vía *unporter* es el $\Delta\mu_{\text{Ca}^{2+}}$, y se acompaña por un descenso en el $\Delta\phi$ o una disminución en la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_o$), estos efectos son exclusivos del eflujo dependiente de Na^+ . El colapso del $\Delta\phi$ seguido de la adición de un translocador de H^+ induce un eflujo rápido de Ca^{2+} el cuál también se observa en presencia de P_i por disociación rápida del complejo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [19,26,54].

g. Efecto del P_i sobre el transporte de Ca^{2+} mitocondrial: Se han observado descargas de Ca^{2+} después de intervalos de 2-20min en medios que contienen P_i debido a la capacidad de este anión de provocar el hinchamiento y deterioro mitocondrial. Esta descarga es dependiente del tiempo y autoacelerante [7].

Se ha observado que el P_i posee la capacidad de disminuir el $\Delta\phi$ y que se acompaña de un eflujo posterior de Ca^{2+} y del mismo P_i , y que es suficiente una concentración de P_i de 0.3mM para inhibir el eflujo de Ca^{2+} un 50% en mitocondrias de hígado [52,53].

Descargas espontáneas de Ca^{2+} en medios con P_i son asociadas con una secuencia de eventos catastróficos que incluyen [7]:

- * Una permeabilidad no específica incrementada de la membrana interna;
- * Hinchamiento de la matriz;

- * Pérdida de K^+ y Mg^{2+} de la matriz;
- * Pérdida de adenín nucleótidos de la matriz;
- * Oxidación o hidrólisis de nucleótidos de nicotín amida de la matriz con un eflujo de nicotín amida;
- * Activación de la fosfolipasa A_2 intramitocondrial y acumulación de ácidos grasos no saturados, y;
- * Colapso del $\Delta\phi$.

V. Interrelación entre el transporte de Ca^{2+} y la translocasa de adenín-nucleótidos:

Desde hace tiempo se sabe que los adenín-nucleótidos (AdN) determinan la capacidad de la mitocondria para acumular y retener grandes cantidades de Ca^{2+} . Debido a ello, se especula acerca de una interrelación entre el transporte de Ca^{2+} y la translocasa de AdN.

Se ha sugerido que los AdN protegen a la mitocondria del hinchamiento inducido por P_i , lo cual daña a la barrera de permeabilidad impuesta por la membrana interna [37].

El Mg^{2+} externo puede inhibir el eflujo de AdN en presencia o ausencia de CAT por lo que el Mg^{2+} y ADP muestran ser complementarios en prevenir los eflujos de Mg^{2+} y AdN por P_i [47].

Los agentes que previenen del eflujo de Mg^{2+} y de AdN también inducen una limitación en la capacidad elemental de acumular y retener Ca^{2+} , lo cual confirma

el papel fundamental del Mg^{2+} y AdN en preservar las propiedades nativas de permeabilidad de la membrana interna mitocondrial [47].

Estudios realizados con CAT demuestran que este promueve la pérdida de Ca^{2+} en mitocondrias de corazón, mientras que el ácido boncreico (AB) inhibe este eflujo, lo cuál sugiere que la unión del ADP por la translocasa esta involucrado en este efecto [37].

Cuando se adiciona ADP + cic-A se mejora el efecto del primero sobre la captación de Ca^{2+} , lo cuál indica que el ADP mejora el transporte de Ca^{2+} directamente estimulando la captación electrogénica [37].

En el mismo estudio se observó que el AB *per se* estimula el transporte de Ca^{2+} de manera análoga a el ADP, lo cuál sugiere que la estimulación del transporte de Ca^{2+} es debida a la localización de la translocasa en un estado conformacional particular denominado como M. El estudio muestra que la simple localización de la translocasa en estado M es suficiente para estimular el transporte de Ca^{2+} [37].

El efecto estimulador de la conformación del translocador sobre la captación de Ca^{2+} se debe a un incremento en la carga negativa de la superficie [37].

VI. El papel de las poliaminas sobre el transporte de Ca^{2+} mitocondrial:

Las poliaminas se encuentran en condiciones normales en diferentes tejidos y sobre éstos pueden tener diferentes efectos; uno de los más importantes es la capacidad de incrementar la captación de Ca^{2+} mitocondrial.

La espermina tiene una $K_{0.5}$ para el transporte de Ca^{2+} que fluctua entre $50-170\mu\text{M}$ y muestra una saturación en la concentración de 0.2mM , se ha encontrado que la espermidina puede activar pero con menor eficiencia (5-10 veces) que la espermina, y la putrescina es totalmente inefectiva [49].

La espermina disminuye la K_m para el transporte de Ca^{2+} e incrementa la velocidad máxima aparente. Sin espermina en mitocondrias de cerebro el eflujo independiente de Na^+ se incrementa rápidamente en forma paralela a incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_o$, mientras que en su presencia el eflujo independiente de Na^+ es muy bajo, mejorando la capacidad amortiguadora de las mitocondrias [51].

El hecho de que la espermina incremente la captación de Ca^{2+} mitocondrial, sugiere que ésta inhibe el eflujo de Ca^{2+} [49].

En 1989 Rottenberg reporta que los efectos de la espermina se deben por su unión a sitios reguladores

asociados a el *unporter* mitocondrial produciendo una activación alostérica del mecanismo de captación de Ca^{2+} y que su efecto mejora si se añade ADP al medio en el caso de mitocondrias de cerebro además de que el efecto se modula por Mg^{2+} [50,51].

La espermina puede jugar un papel fisiológico importante en la regulación de la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial debido a que no altera ninguna función del transporte de Ca^{2+} mitocondrial y a que actúa en concentraciones comprendidas en niveles celulares, pero algunos autores indican que la presencia de la misma es irrelevante para la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} de la mitocondria *in vivo* [49,50].

VII. Ciclo del Ca^{2+} . La integración del *unporter* y la ruta de eflujo:

a. La regulación en estado estacionario de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$: La actividad de la ruta de eflujo es independiente del Ca^{2+} total en la matriz en presencia de P_i . El punto en el cual la captación y eflujo se encuentran en un balance puede ser logrado a elevadas $[\text{Ca}^{2+}]_o$ por la activación de la ruta de eflujo o por inhibición del *unporter*, una disminución en el $\Delta\phi$ después de la captación de Ca^{2+} vía *unporter*, activa el eflujo independiente de RR [7].

El agotamiento del P_i endógeno provoca que la $[Ca^{2+}]_m$ se incremente marcadamente debido a la incapacidad de formar $Ca_3(PO_4)_2$ y éste *per se* activa la ruta de eflujo. La combinación de los dos factores mencionados provoca un gran incremento en el eflujo inducido por RR [7].

b. La regulación del contenido de Ca^{2+} en la matriz y su papel fisiológico: La $[Ca^{2+}]_m$ es mantenida mediante la formación de complejos de $Ca_3(PO_4)_2$, por la velocidad de respiración, por la actividad de los *anypoters* y por la membrana plasmática [7,19,23].

Esta regulación ocurre *in vivo* y representa un papel mayoritario para las rutas de transporte mitocondrial, para controlar la actividad de ciertas deshidrogenasas (DHS) de la matriz dependientes de Ca^{2+} , aunque la función de la mitocondria como sistema *buffer* de Ca^{2+} no es fácil de comprender [17,59].

El Ca^{2+} incrementa la actividad de tres DHS intramitocondriales claves en el metabolismo oxidativo en concentraciones de Ca^{2+} comprendidas entre $0.1-10\mu M$, lo cual muestra que el Ca^{2+} puede ser un regulador importante en el metabolismo, sobre todo en mitocondrias de mamífero [13]. Si esta suposición es cierta, entonces la función del ciclo del Ca^{2+} en la membrana interna mitocondrial podría tener un significado importantísimo en la determinación de la

concentración de $[Ca^{2+}]_m$.

El complejo de la piruvato-DH (PDH) de fuentes de mamífero puede activarse por Ca^{2+} en presencia de Mg^{2+} saturante utilizando amortiguadores de Ca^{2+} /EGTA con una $K_{0.5}$ cercana a $1\mu M$; el Na^+ y Mg^{2+} incrementan aproximadamente 4 veces el valor de $K_{0.5}$ [13,55,56,61].

El efecto del Ca^{2+} sobre la piruvato-DH se acompaña de un incremento en el valor de V_{max} efectiva del complejo [7].

El efecto del Ca^{2+} sobre la isocitrato-DH (ICDH) y sobre la α -cetoglutarato-DH (α -CGDH) se acompaña de una disminución en el valor de K_m para sus respectivos sustratos ($1-5\mu M$ y $2.7\mu M$) sin afectar el valor de V_{max} , ambas enzimas muestran una $K_{0.5}$ para Ca^{2+} de $1\mu M$ [13,58,59].

En ausencia de Ca^{2+} , el Na^+ o Mg^{2+} no tienen efecto sobre la oxidación de α -cetoglutarato (α -cg), pero a una concentración de Ca^{2+} de $50nM$ la presencia de alguno de ellos disminuyó notablemente la velocidad de oxidación del sustrato y este efecto se pierde cuando la $[Ca^{2+}]_0$ es mayor a $210nM$, aunque se incrementa la $K_{0.5}$ para Ca^{2+} hasta un valor de $320nM$ [58].

El 50% de activación para la α -CGDH se da en aproximadamente $0.5nmol$ de Ca^{2+}/mgp cuando el medio contiene P_i+Mg^{2+} y esta actividad es máxima cuando el

Ca^{2+} alcanza niveles de 2nmol/mgp [16,64].

Se ha mostrado que el control de la α -CGDH en mitocondrias de corazón por Ca^{2+} funciona en el rango de 2nM - $1.2\mu\text{M}$ de Ca^{2+} libre, lo cuál también se cumple para la PDH. Esto es importante, ya que esa concentración se ubica en el rango fisiológico de Ca^{2+} mitocondrial implicando la posible regulación del metabolismo oxidativo por este organelo [16,62].

El efecto del Ca^{2+} sobre la ICDH puede ser modificada por la presencia de ADP en el medio debido a que la enzima posee un sitio de unión al nucleótido que disminuye la sensibilidad de la enzima a el catión [57].

Estudios recientes sugieren que el Ca^{2+} pueda interaccionar de forma positiva con algunas de las enzimas que integran la cadena respiratoria, hasta ahora se ha sugerido que pueda activar a el acarreador de AdN, ATP-sintetasa y complejo $b\text{-}c_1$ [90,94,98].

VIII. Modulación hormonal del ciclo del Ca^{2+} :

El *status* hormonal inmediatamente antes de morir puede afectar un gran número de propiedades mitocondriales. Se ha investigado la acción del glucagon en células perfundidas y en mitocondrias aisladas de hígado encontrando que se incrementa el metabolismo de piruvato en estado 3 de la respiración así como el contenido total de adenín nucleótidos, se

activa el ciclo-TCA, la ATP-sintetasa, y el *antypor*ter $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [7].

El glucagon también puede activar a el *antypor*ter $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [22].

La fenilefrina tiene la capacidad de disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ e incrementarla aproximadamente dos veces en mitocondrias aisladas. Esto indica que la interacción de la fenilefrina con los receptores α_1 de la membrana plasmática en hígado resultan en un rápido incremento en la afinidad de sitios de unión a Ca^{2+} mitocondriales, la hormona disminuye la K_m para Ca^{2+} aproximadamente el 50%, esto no se observa con glucagon [14].

La isoprenalina estimula la actividad del *antypor*ter $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en un 50% sin afectar a el sistema de eflujo independiente de Na^+ [22].

También se ha reportado una activación α -adrenérgica del *unypor*ter de Ca^{2+} en mitocondrias de corazón obtenidas a partir del órgano perfundido con adrenalina o fenilefrina, estas hormonas también incrementan la velocidad de oxidación de succinato y NADH [7].

La metoxamina y adrenalina no causan una elevación significativa del $\Delta\phi$ durante la velocidad de influjo, lo cuál indica que las propiedades cinéticas del *unypor*ter mitocondrial en corazón podrían ser

modificadas por un mecanismo α -adrenérgico [22].

La administración de adrenalina a corazones perfundidos de ratas desencadena una activación de la PDH y α -CGDH, este efecto es abolido por Na^+ y es sensible a diltiazem [19].

Las prostaglandinas y en especial la prostaglandina E_1 pueden inducir la pérdida de Ca^{2+} intramitocondrial, y se ha sugerido que podrían actuar como ionóforos de Ca^{2+} naturales [10].

Todo esto indica que las propiedades cinéticas del *antypor*ter y *unypor*ter podrían responder a dos diferentes condiciones: La primera de ellas constituye el estado hormonal del tejido, y la segunda a el estado energético de las mismas mitocondrias [22].

Capítulo I

1.1. ANTECEDENTES

La continua adaptación de la célula viva a los cambios ambientales es una condición indispensable para su preservación. La necesidad de mantener la constancia del medio intracelular u homeostasis celular requiere de mecanismos de control metabólico capaces de ajustar el funcionamiento celular a esos cambios externos. Por ello existe un constante interés en como este organismo puede mantener dicha homeostasis. Diversas teorías que abordan estos temas han sido desarrolladas, pero la información que la mayor parte de ellas proporciona es limitada, ya que sólo evalúan de una forma cualitativa los mecanismos que controlan la homeostasis sin considerar la contribución de los factores que también podrían estar involucrados en el control de la misma.

Una de las teorías más interesantes que abordan el estudio de estos temas es, sin duda alguna, la desarrollada simultáneamente en 1973 por H. Kacser y J.A. Burns en Escocia y Heinrich y Rapoport en Alemania la cual se ha denominado como Teoría de Control Metabólico[70,71].

1.1.1. Teoría de Control Metabólico:

Esta teoría de análisis metabólico ensaya cuantitativamente el grado de control ejercido por cada paso en una vía metabólica y establece la base teórica para la evaluación de la interrelación entre actividades enzimáticas relativas y su contribución a el control ejercido sobre el flujo de la ruta [72,78].

La teoría se puede aplicar a cualquier sucesión lineal, bloqueada o cíclica de translocaciones de solutos y transformaciones químicas en cualquier organelo subcelular, célula, tejido u organismo de cualquier complejidad [73].

El análisis de estos autores propone que las variables de una vía metabólica son los niveles de metabolitos y que en el estado estacionario, las concentraciones de los intermediarios no varían con el tiempo, puesto que cada uno de ellos ha alcanzado un balance de formación y remoción que depende de la actividad de todas las enzimas; por esto, las concentraciones de los intermediarios y los flujos están determinados por los parámetros del sistema [71,73].

El flujo es una propiedad sistémica, pues la disminución de la actividad de una enzima a cero resulta en la anulación de la vía y las cuestiones

acerca de su regulación no pueden ser contestadas estudiando una etapa aislada. Los parámetros del sistema están representados por las constantes enzimáticas determinadas genéticamente como constante de Michaelis (K_m), la constante catalítica (K_{cat}), las constantes de inhibición (K_i), etc [70,71,74,75].

La evaluación cuantitativa del control de flujo se logra mediante la estimación del coeficiente de control de flujo (C_i) y los coeficientes de elasticidad (ϵ) [70,71,72].

1.1.1.1. Coeficiente de Control de Flujo:

Es posible evaluar la magnitud de los efectos de una variación sobre alguna de las enzimas que integran una vía metabólica mediante la inducción de pequeños cambios en la actividad de una enzima dada ($\partial E_i/E_i$) y midiendo el flujo del nuevo estado estacionario ($\partial F/F$). La comparación de estas medidas representa cómo el cambio inducido en la enzima afecta al flujo [70,71,72]:

$$\partial F/F = C_i \partial E_i/E_i$$

Y de la ecuación anterior se puede obtener:

$$C_i = E_i/F \partial F/\partial E_i$$

La constante de proporcionalidad C_i describe cuantitativamente que tan sensible es el flujo a cambios en una de las enzimas que integran la vía y fue denominado originalmente como coeficiente de

sensibilidad, pero en 1984 se denominó como coeficiente de control de flujo por el Comité de Nomenclatura de la Unión de Bioquímica Internacional [74,81].

Una pequeña variación en la actividad de una enzima dada, que resulta en un gran impacto sobre el flujo, indica que esa enzima posee un elevado valor de C_i y por lo tanto ejerce control significativo sobre el flujo de la ruta. En contraste, cuando una variación prolongada en una enzima no da como resultado una modificación significativa de todo el flujo, indica que esa enzima no ejerce control y por lo tanto posee un valor de C_i pequeño [72,81].

La velocidad de una reacción enzimática siempre es una función lineal de la concentración de enzima y del número de recambio, sin importar que tan compleja sea ésta. En el estado estacionario, se cumple la siguiente expresión [70,71,72,73]:

$$\sum_{i=1}^{i=n} C_i = 1$$

Este postulado se ha denominado como la propiedad de la sumatoria [70] y tiene una serie de importantes consecuencias [70,71,72,75]:

a) Cuando la actividad de una enzima determinada cambia, el valor de los C_i puede cambiar también de tal forma que la nueva distribución de control que sea establecida pueda dar nuevamente la unidad.

b) Los C_i son positivos, pues se podrán generar coeficientes negativos sólo en vías metabólicas que eventualmente tuvieran fugas. Bajo estas circunstancias la suma de los C_i puede ser mayor a uno.

c) Si un coeficiente tiene un valor cercano a la unidad, el resto serán muy pequeños.

1.1.1.2. Medición cuantitativa de los C_i :

Se han propuesto tres metodologías para evaluar cuantitativamente los C_i y todos se fundamentan en variar la concentración efectiva de enzima para su cálculo:

1. El grupo de Kacser ha utilizado la variación genética de mutantes de *Neurospora crassa* para manipular las concentraciones de las enzimas de la biosíntesis de arginina y urea [80,81].

2. Diversos investigadores han diseñado modelos matemáticos adecuados que posteriormente son evaluados experimentalmente a través de la medición de algunas constantes cinéticas [76,79].

Uno de estos métodos desarrollado por Asck K. Sen, se ha denominado como: Procedimiento de inversión de matrices, el cuál consiste en expresar las ecuaciones que gobiernan los C_i en forma de una matriz de coeficientes de elasticidad [79].

3. El método de inhibición específica para la modificación de las actividades enzimáticas:

Este método fue diseñado por el grupo de Westerhoff y Tager, donde la idea básica es la de titular el flujo metabólico con diferentes inhibidores y calcular la pendiente inicial de la curva de inhibición, en donde el valor del C_i dependerá en gran parte de la naturaleza y grado de interacción que éste tenga con la enzima, es por ello que se han propuesto diferentes ecuaciones para cada tipo de inhibición [70,71,72,80,91]:

Para inhibición de tipo irreversible:

$$C_i = - I_{\max}/F_0 (dF/dI)_{[I] \rightarrow 0}$$

Para inhibición no-competitiva:

$$C_i = - K_i/F_0 (dF/dI)_{[I] \rightarrow 0}$$

Para inhibición competitiva:

$$C_i = - K_i (1+s/K_m) F_0 (dF/dI)_{[I] \rightarrow 0}$$

donde F_0 es la referencia del flujo no inhibido, I_{\max} la cantidad mínima de inhibidor para obtener la máxima disminución del flujo, K_i constante de inhibición, K_m constante de Michaelis y dF/dI la pendiente de la curva de inhibición.

El procedimiento experimental para calcular C_i consiste en determinar la pendiente inicial de la curva de inhibición y relacionar este valor con la velocidad de flujo no inhibido y los correspondientes parámetros cinéticos. Se considera la pendiente inicial porque aquí ocurre una inhibición lineal que permite

extrapolar el nivel inicial del estado estacionario, que es el estado de interés [72,73,81].

El empleo de un inhibidor de tipo irreversible es el más confiable para la evaluación de los C_i , debido a que el empleo de inhibidores de tipo competitivo y no competitivo requiere saber parámetros cinéticos usualmente medidos en condiciones diferentes a las empleadas [73,81,91].

El método de inhibición específica presenta algunas inconsistencias en la medición de los C_i debidas principalmente a el empleo de inhibidores para titular el flujo [72,74,81]:

a) No existe un criterio analítico para decidir a partir de qué rango de concentraciones de inhibidor se debe iniciar la titulación del flujo. Existe un criterio semiempírico que señala el iniciar la titulación del flujo con una cantidad de inhibidor igual a $0.1K_i$.

b) Cuando se emplean inhibidores irreversibles, se requiere identificar cual es la concentración mínima necesaria de inhibidor para alcanzar la inhibición máxima. Además no siempre pueden garantizarse las condiciones óptimas para la unión estequiométrica del inhibidor a su enzima.

c) En el caso de inhibidores reversibles se requiere conocer las constantes de inhibición y de

Michaelis, además de la concentración real de sustrato.

1.1.1.3. Coeficientes de Elasticidad y Teorema de Conectividad:

El valor del C_i de una enzima no es exclusivamente determinado por las propiedades de la misma, ya que también intervienen las propiedades de otras enzimas integrantes del sistema y la estructura metabólica del mismo, estas interacciones y efectos son descritos por otro grupo de coeficientes denominados como coeficientes de elasticidad (ϵ) [77,80].

Pueden existir tantos ϵ para una enzima (o acarreador) como metabolitos interaccionen con ella. El producto de un ϵ y cualquier cambio reelevante en la concentración de metabolito da una respuesta local [77,80].

Una importante consecuencia de demostrar que las respuestas del sistema fueron generadas por la acción conjunta de todas las respuestas locales en un sistema metabólico intacto es el establecimiento de la propiedad de conectividad. Esta establece que las relaciones de los C_i de los pasos adyacentes es igual a las relaciones de los dos ϵ con respecto a el sustrato en común [77,80]:

$$\begin{array}{c} J \\ C \\ E_1 \end{array} \begin{array}{c} 2 \\ [e] \\ 1 \end{array} \\ \hline \begin{array}{c} J \\ C \\ E_2 \end{array} \begin{array}{c} 1 \\ [e] \\ 2 \end{array}$$

Esta propiedad de conectividad provee un método adicional para determinar la importancia relativa de los pasos en una ruta metabólica [77,80].

1.1.1.4. Estudios de control a nivel de la fosforilación oxidativa:

La pregunta de cual o cuales pasos controlan la fosforilación oxidativa mitocondrial ha originado una gran controversia.

Se ha llegado a la conclusión de que los primeros dos sitios de la cadena respiratoria, incluyendo a el translocador de AdN están en equilibrio cercano en una gran variedad de mitocondrias, debido a ello se presupone que estos sitios pierden energía libre y por lo tanto la regulación de la fosforilación oxidativa podría ser exclusivamente debida a la reducción irreversible del oxígeno molecular a agua por la citocromo-oxidasa [84,91,96].

Por otra parte, el control de la respiración por el potencial de P_i extramitocondrial sugiere que pueda existir un control de tipo cinético no significativo a nivel de la translocasa de AdN [89,91,96].

Investigaciones a nivel de el acarreador de AdN utilizando carboxiatractilósido (CAT) para su titulación, apoyan el hecho de que el acarreador de AdN es limitante en la velocidad de la fosforilación oxidativa [81,84,85].

En estudios realizados en mitocondrias de corazón de perro y paloma se ha observado una dependencia de la respiración sobre las concentraciones de ATP, ADP y P_i extramitocondrial lo que indica que la translocasa de AdN es importante en la regulación del flujo en esa vía, esto también es observado en mitocondrias de riñón e hígado de rata y en hepatocitos aislados [82,83].

Se ha observado que el grado de control que ejerce el acarreador de AdN sobre la velocidad en estado de equilibrio de la respiración no solamente depende del flujo a través de la cadena respiratoria sino también sobre la forma en la cuál el flujo es provocado [85,86,95].

Diversos estudios realizados aplicando la teoría de control metabólico muestran que el control de la fosforilación oxidativa en mitocondrias aisladas es de

naturaleza multifacética y se ha establecido que el acarreador de AdN, la ATP-sintetasa, citocromo-oxidasa, citocromo b-c₁ y el acarreador de dicarboxilos son sitios importantes donde se ejerce el control, además que la ATP-sintetasa posee un valor de C_i de 0.57 en ratones recién nacidos y esto no parece mantenerse en adultos [87,90,91,92,95,97].

Moreno-Sánchez ha mostrado que el translocador de AdN y la ATP-sintetasa están acopladas secuencialmente através de un intermediario común (la relación intramitocondrial de ATP/ADP) y han mostrado que en ausencia de el acarreador de AdN el control recae sobre la ATP-sintetasa, por lo que se sugiere que la actividad de ambas enzimas se regule de manera opuesta [94,95,97].

En el mismo estudio, este autor demuestra que la velocidad de la respiración acoplada a la síntesis de ATP es totalmente regulada por la actividad del traslocador de AdN, y que esta regulación, es parcial en la arsenilación [94].

Estudios realizados por Groen y cols, muestran que el valor de C_i y por lo tanto el grado de control de la ATP-sintetasa y el translocador de AdN dependen directamente de cambios en el Δ ϕ [88,92,93].

Utilizando la teoría de control metabólico Moreno-Sánchez establece que existe una

estrecha relación entre la actividad de las deshidrogenasas sensibles a Ca^{2+} y el grado de control ejercido por las diferentes enzimas que integran la fosforilación oxidativa, especialmente entre la ATP-sintetasa y el acarreador de AdN [90].

En otro estudio Moreno-Sánchez y cols, observaron que en mitocondrias de corazón el control predominante con una baja estimulación de las DHS sensibles a Ca^{2+} lo ejercen el acarreador de AdN y el sitio I, y mitocondrias de riñón el acarreador de P_i y el acarreador de AdN. Incrementando la actividad de dichas DHS con Ca^{2+} el control del acarreador y sitio I disminuyen incrementándose a su vez el control de la ATP-sintetasa y el del acarreador de P_i [98].

La contribución de las DHS a el control del flujo metabólico también se ha estudiado en células integras (hepatocitos) observando, al igual que en mitocondrias, que depende fuertemente de la relación NADH/NAD^+ [97].

El candidato obvio para el control de la respiración en estado 4 es la permeabilidad pasiva a H^+ de la membrana mitocondrial, el control que este ejerce en estado 4 es elevado y progresivamente va disminuyendo conforme la velocidad de respiración alcanza el estado 3 [90,91,94,98].

1.1.1.5. Un Nuevo Modelo para Estudios de Teoría de Control Metabólico:

Hasta ahora todos los estudios realizados a nivel de control de la fosforilación oxidativa se han llevado a cabo en mitocondrias o células de mamífero consideradas como "normales".

Todas estas presentan una similaridad muy grande en cuanto a sus estructuras, composición, regulación metabólica y función; es por ello que sería interesante estudiar el control de esta ruta en células de mamífero que muestren diferencias notables en cuanto a esos mecanismos de regulación, funciones y composición además que ofrezcan características importantes y ciertas ventajas con respecto a las mitocondrias normales para su estudio.

Sería difícil que todas estas características las pudiese reunir un tejido que normalmente cumple alguna función integrando parte de un ser más complejo, pero las podemos encontrar en un tipo de células también de mamífero, pero que normalmente "no forman parte de un tejido" ni cumplen alguna función para el ser del que forman parte: me refiero a las células cancerosas.

Las células cancerosas han sido extensamente estudiadas a nivel de diversos aspectos metabólicos, y han mostrado tener diferencias muy significativas con respecto a las células de tejidos normales por ejemplo:

Se ha estudiado la utilización de diferentes aminoácidos (aas) y glucosa por células tumorales de líquido de ascitis encontrando que el 93% de la glucosa se transforma a lactato, el 0.7% es utilizada por la vía de las pentosas fosfato, 1.5% por el ciclo-TCA y el 2% para la síntesis de lípidos [99].

Se ha encontrado que la producción de ATP es derivada en un 78% de la conversión de glucosa a lactato y el 19% de la oxidación de glutamina. Que utilizan la leucina de una manera incrementada con respecto a células normales el debido a la alta velocidad de la síntesis de proteínas y de lípidos y que sintetizan un 80% de esteroides del total de lípidos a partir de leucina y glucosa [99,109].

Además se ha atribuido como una característica de todos los tumores la de tener una elevada velocidad de glicólisis aerobia [99].

También se ha observado que las células tumorales parecen tener disminuido el número de mitocondrias con respecto a las células normales debido a que sus seis DNs mitocondriales parecen estar disminuidas en cuanto a su actividad [99].

Se ha mostrado que las células de diversos tumores muestran una disminución en la actividad de citocromo-oxidasa y succinato citocromo c-óxidoreductasa. El estudio de los citocromos a, b, c₁ y c revela que se

encuentran de forma deficiente (disminuidos) con respecto a las células de tejidos normales [100].

Mitocondrias aisladas de hepatoma de Ehrlich muestran tener mecanismos de transporte de Ca^{2+} muy semejantes a las de tejidos normales (diferentes a los de hígado), sin embargo su comportamiento metabólico en presencia del ión parece diferir demasiado con el de una célula normal [101,102].

Debido a que aunque poseen los mecanismos de transporte de Ca^{2+} que normalmente contienen las mitocondrias normales, acumulan excesivas cantidades de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial (conteniendo cantidades de Ca^{2+} que fluctúan entre 50-70ng de iones Ca^{2+} /mgp), y esta acumulación se induce aun más en presencia de AdN, por ello se propone que la membrana interna de mitocondrias tumorales es altamente resistente a la acción desacoplante del Ca^{2+} y a concentraciones no fisiológicas del ión [103].

Se ha estudiado el efecto del Ca^{2+} a nivel de la fosforilación oxidativa en mitocondrias tumorales, encontrando que la fosforilación es fuertemente inhibida por iones Ca^{2+} , Sr^{2+} y Mn^{2+} , aunque las enzimas de la cadena respiratoria permanecen funcionales, por lo que se sugiere que el efecto inhibitor del Ca^{2+} intramitocondrial sobre la fosforilación oxidativa no se debe a un efecto desacoplante y que se deba a que

inhibe a uno o más de tres posibles actividades necesarias para la respiración fosforilante [104,105,107].

Estudios realizados a nivel de la ATP-sintetasa mitocondrial en tumores han mostrado que esta enzima es afectada directamente por el contenido endógeno de Mg^{2+} , y que estas mitocondrias son altamente permeables a el ión durante la incubación con desacoplantes, reduciendo el efecto de los mismos sobre la fosforilación [106].

Se han encontrado diversas anormalidades en las rutas que oxidan piruvato, ya que se ha visto que uno de los principales productos del metabolismo de piruvato es la acetoína, la cual se degrada rápidamente en una reacción dependiente de ATP acompañada por la formación de pequeñas cantidades de citrato y dos productos no identificados [110,111].

La formación de acetoína por mitocondrias tumorales aparentemente ocurre en dos pasos (Fig.5): El primero de ellos consiste en la descarboxilación no oxidativa del piruvato presumiblemente vía unión al β -hidroximetil-amino-pirofosfato, (un precursor de acetoína), este paso probablemente no requiere ATP y; el segundo paso podría deberse a la formación de 1,2-propanodiol-fosfato, reportado para ser el mayor producto de metabolismo anaeróbico del piruvato en

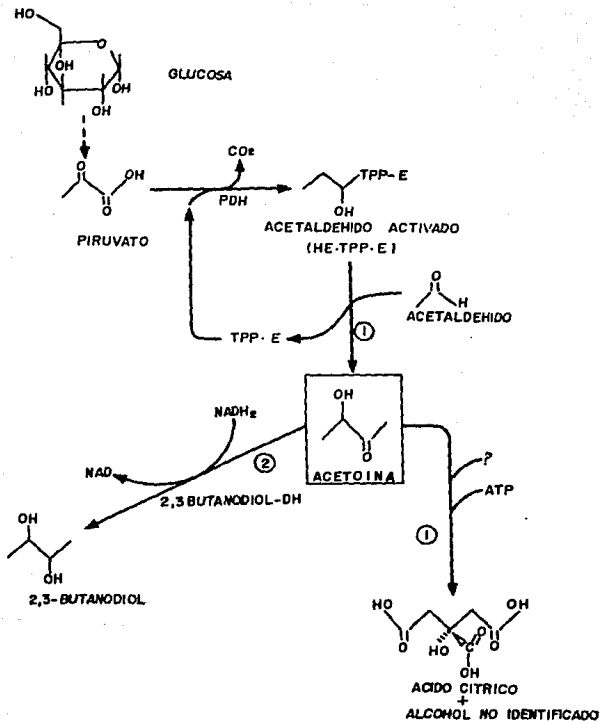


Figura 5. Representación esquemática de la ruta seguida por mitocondrias tumorales para la formación de acetoina a partir de glucosa. La ruta 1 se ha encontrado en células cancerosas glicolíticas, y la ruta 2 está presente en otras condiciones patológicas como el alcoholismo. Abreviaturas: PDH: Complejo de la piruvato deshidrogenasa, HE-TPP-E: Complejo enzimático de tiamina pirofosfato.

células tumorales. La formación de piruvato a partir de acetoina parece ser la ruta minoritaria del metabolismo de acetoina y esta produce en gran medida la inhibición de la succinato-DH [111].

Otras anomalías que presentan las mitocondrias tumorales con respecto a las normales son: La regulación del complejo mitocondrial de la PDH ya que se activa por AMP y parece ser la responsable directa de la producción de acetoina, lo cual no ocurre en tejidos normales y; la inhibición de la fosforilación oxidativa por aldehidos alifáticos debido a la carencia de aldehido-DHs [110,111,113].

Existe también una elevada síntesis de esteroides, que parece deberse a que la regulación de la síntesis *de novo* de estos compuestos es anormal, ya que existe una pérdida de control significativa sobre la colesterogénesis a nivel de la enzima clave de la ruta (hidroximetil-glutaril-CoA-reductasa), la cual no responde a los mecanismos de retroalimentación que existen en tejidos normales. Esta elevada síntesis ocasiona que las membranas mitocondriales contengan elevadas cantidades de colesterol [108].

Debido a todas las alteraciones existentes en el metabolismo de células y particularmente en mitocondrias tumorales se ha propuesto que estas poseen un "ciclo-TCA truncado" (Fig.6) [113].

Los elementos que sugieren este modelo son:

- (1) La glutamina es la principal fuente de energía en mitocondrias tumorales y;
- (2) En el ciclo-TCA el citrato no es completamente oxidado a CO_2 , ya que abandona a la mitocondria para proveer una fuente de unidades acetilo para la síntesis de colesterol y ácidos grasos [112,113].

La oxidación de glutamina es vía una glutaminasa mitocondrial para convertirse en glutamato e ingresar a el ciclo-TCA mediante reacciones de transaminación; se ha observado que la malato-DH (MDH) de mitocondrias tumorales es dependiente de NADP^+ (figura 6) y se propone que ella cataliza el flujo de malato al piruvato requerido para la oxidación de los carbonos de la glutamina a CO_2 [112,115].

Menos del 3% del citrato total es transformado en acetato en presencia o ausencia de glutamina, indicando que el flujo es a través de la vía [112,115]:

Succinato ----> Piruvato ----> AcetilCoA ----> Citrato.

El truncamiento del ciclo-TCA es a nivel del citrato, ya que éste da origen a la síntesis de colesterol citoplásmico debido a que sale de la mitocondria al citoplasma para la síntesis del mismo y se cree que la causa de la acumulación de colesterol sobre las membranas se deba a una disminución de la proteína acarreadora de esteroides en líneas celulares

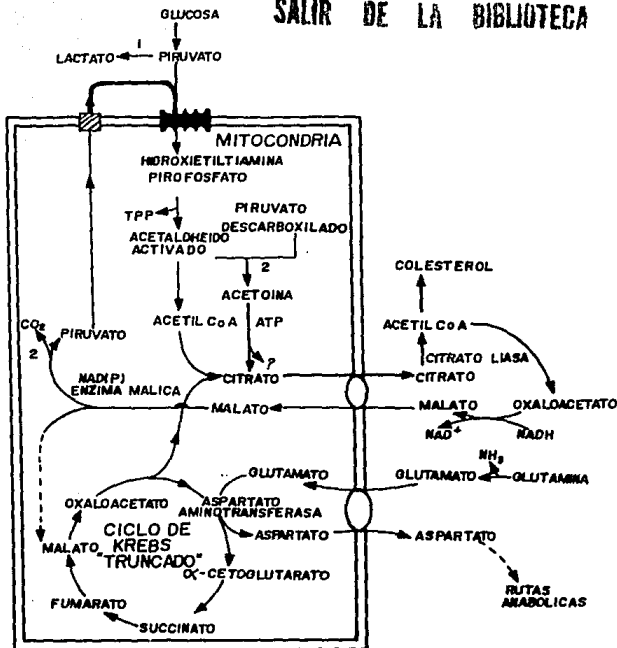


Figura 6. Representación esquemática de algunas derivaciones del metabolismo central de células tumorales altamente glicolíticas. (1) Cerca del 90% del piruvato derivado de la degradación de glucosa es reducido a lactato, mientras una muy pequeña cantidad es oxidada vía el complejo PDH. (2) El piruvato adicionado es metabolizado a acetoina, la cual es convertida a otros productos en la matriz mitocondrial. (3) El citrato se "fuga" del Ciclo de Krebs para pasar a citoplasma y desregular la síntesis de colesterol (4) La glutamina es el mejor sustrato para el Ciclo de Krebs de células tumorales. (5) Al adicionar malato, éste ingresa a la mitocondria para oxidarse a piruvato + CO₂ por una enzima malica dependiente de NAD(P), mientras el malato generado en la matriz a partir de glutamato es oxidado a oxaloacetato vía Ciclo de Krebs.

tumorales [113].

El malato intramitocondrial es transformado a oxaloacetato vía MDH mitocondrial, mientras el malato citoplásmico es preferentemente transformado a piruvato más CO_2 por la enzima málica anormal, dependiente de NADP^+ intramitocondrial, regenerando la fuente de citrato, y se propone que esta enzima "anormal" esté unida a la superficie de la membrana interna mitocondrial en cercana asociación con el sistema de transporte de malato, implicando una segregación de enzima málica dependiente de NADP^+ y MDH mitocondrial en mitocondrias de células cancerosas [113].

Un estudio reciente realizado por Anne N. Murphy, y cols [114]., parece contradecir muchos de los estudios realizados en el metabolismo de mitocondrias tumorales, particularmente en la regulación del metabolismo mitocondrial por Ca^{2+} ; este estudio muestra que las DHS de mitocondrias tumorales, particularmente de la línea AS-30D pueden ser activadas y reguladas por iones Ca^{2+} aunque muestran una dependencia mucho menor que las mitocondrias de tejidos normales a el ión [114].

Se reporta activación a nivel de la α -CGDH con una $K_{0.5}$ para el ión Ca^{2+} de $0.7 \pm 0.05 \mu\text{M}$ acompañada por una estimulación en la respiración de hasta un 75% en presencia de 5mM de glutamato y sólo del 33% cuando el

2-oxoglutarato se emplea como sustrato en concentraciones de 0.2mM y se detectan muy pequeños efectos con concentraciones del sustrato mayores o iguales de 10mM.

Encuentran una activación del 16% cuando se utiliza como sustrato el isocitrato, y con succinato como sustrato, no se encuentra activación por Ca^{2+} [114].

En este trabajo se concluye que la sensibilidad a Ca^{2+} del estado 3 de la respiración podría resultar desde una modulación por Ca^{2+} de las actividades de las DHs o, en su defecto, otras actividades como las del transporte de electrones, de ATP/ADP y la actividad de la ATP-sintetasa o alguna combinación de éstos [114].

1.1.2. Indicadores fluorescentes: una nueva manera de estudiar eventos relacionados con Ca^{2+} .

Muy recientemente ha surgido una nueva metodología para estudiar el transporte de Ca^{2+} y eventos relacionados con este catión. Estudios realizados por diversos investigadores reportan la síntesis de nuevos compuestos con la capacidad de quelar Ca^{2+} y fluorecer, abriendo un nuevo e importante campo para el estudio de eventos relacionados con ciertos cationes.

Estos compuestos se han denominado como indicadores fluorescentes, de los cuáles existen diversas afinidades para diferentes elementos [123,124], pero el presente estudio se centrará exclusivamente en los descritos para Ca^{2+} .

Los indicadores fluorescentes para Ca^{2+} se han dividido en tres generaciones [119,118]: Los indicadores de primera generación, y por lo tanto los primeros que se describen en la literatura, corresponden a el denominado como Quin-2AM [119,118]; los de segunda generación corresponden a Fura 2, e Indo 1; por último los de tercera generación y, por tanto los más eficientes, entre los cuáles se encuentra el Fluo 3AM.

Estos indicadores ofrecen diversas ventajas con respecto a los métodos convencionales para el estudio de los procesos involucrados con Ca^{2+} : La más importante de ellas es que no comprometen la integridad celular o del organelo con el que se esta trabajando, y además no alteran la homeostasis de Ca^{2+} , poseen una rápida velocidad de respuesta y el rango de sensibilidad para Ca^{2+} está en el considerado como fisiológico [119,125].

Hasta ahora se han realizado pocos estudios de transporte de Ca^{2+} utilizando como estrategia el medir

la concentración de Ca^{2+} libre mitocondrial.

En un estudio realizado por Moreno-Sánchez y Hansford [126] en mitocondrias de corazón utilizando como indicador fluorescente para Ca^{2+} al Indo-1AM establecen que la concentración de Ca^{2+} libre es de 95nM y que la concentración del gradiente mitocondrial $[\text{Ca}^{2+}]_m/[\text{Ca}^{2+}]_o$ tenía un valor cercano a la unidad cuando las mitocondrias eran incubadas en un medio que contenía una concentración de 10mM de Na^+ , y que el Mg^{2+} en una concentración de 1mM reducía dicho gradiente a la mitad.

En el mismo estudio [126], también se reporta que la espermina puede incrementar el gradiente hasta llevarlo al valor de la unidad en presencia de 1mM de Mg^{2+} .

En otro reporte McCormack y cols. [127], utilizando como indicador al Fura-2AM, confirman que cuando las mitocondrias de corazón son incubadas en condiciones cercanas a las fisiológicas de Na^+ y Mg^{2+} y a bajas concentraciones de Ca^{2+} extramitocondrial (<400nM), se establecía un gradiente de Ca^{2+} menor a la unidad y que a elevadas concentraciones de Ca^{2+} , que caían dentro del rango fisiológico, el gradiente era mayor que la unidad, indicando así la elevada naturaleza cooperativa de la transmisión de señal por Ca^{2+} a la matriz bajo esas condiciones.

Kao, y cols., caracterizan el comportamiento de un nuevo indicador fluorescente para Ca^{2+} , el cual se ha denominado como Fluo-3AM [129]. Este indicador da una señal diez veces mayor que la autofluorescencia intrínseca de la preparación y tiene una constante de disociación del complejo Fluo- Ca^{2+} 40 veces mayor a la descrita en los otros indicadores para Ca^{2+} .

Saavedra-Molina y cols., [128] reportan un estudio de Ca^{2+} en mitocondrias de hígado realizado con el indicador de tercera generación Fluo-3AM. En el estudio se establece que la autofluorescencia de la preparación mitocondrial no interfiere con la señal emitida por el complejo Fluo- Ca^{2+} debido a que este indicador posee longitudes de onda superiores o iguales a 500nm. Los autores reportaron también que cuando las mitocondrias son incubadas en ausencia de Ca^{2+} externo, la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ corresponde a 100nM, la cuál es muy cercana a la establecida por Moreno-Sánchez y Hansford [126,128].

Capítulo II.

1.2. Objetivos

Con base en todos los estudios realizados en mitocondrias de mamifero a nivel de control de la fosforilación oxidativa y transporte de Ca^{2+} mitocondrial y, en que el modelo de mitocondrias de hepatoma es un sistema nuevo y atractivo para el estudio de la distribución de control a nivel de dicha ruta, nuestros primeros objetivos fueron:

1.2.1. Evaluar la distribución de control en mitocondrias de hepatoma a nivel de la fosforilación oxidativa.

1.2.2. Evaluar la intervención del Ca^{2+} en ciertos aspectos del metabolismo llevado a cabo en estas mitocondrias, específicamente a nivel de la fosforilación oxidativa y deshidrogenasas del Ciclo de Krebs.

Por lo que se refiere al transporte de Ca^{2+} , al ser las mitocondrias de corazón un sistema bien caracterizado y, teniendo en cuenta que los estudios realizados con indicadores fluorescentes para Ca^{2+} sugieren que la velocidad de influjo del catión puede llegar a ser menor que la de eflujo en condiciones muy cercanas a las fisiológicas, el tercer y último objetivo fue:

1.2.3. Examinar las contribuciones relativas de los intercambiadores $2\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$, y $2\text{H}^+ / \text{Ca}^{2+}$ en la

determinación de la concentración interna de Ca^{2+} libre
mitocondrial $[\text{Ca}^{2+}]_m$.

Capitulo III.

1.3.MATERIALES Y METODOS.

Los materiales y métodos empleados para el estudio realizado con mitocondrias de hepatoma fue la siguiente:

1.3.1.Conservación de la línea tumoral:

La línea tumoral empleada para este estudio fue donada por el Dr. J. Adolfo García Sáinz del IFC.

Esta es una línea de hepatoma de rata denominada como AS-30D, la cual tiene la particularidad de desarrollarse en el líquido de ascitis que es acumulado en el abdomen de el animal, por ello, para la conservación de la línea tumoral se inoculaban intraperitonealmente ratas *Wistar* hembra con un peso comprendido entre 250-300g con 2.0ml de líquido de ascitis proveniente de otra rata.

1.3.2.Aislamiento de mitocondrias:

El aislamiento de las mitocondrias de hepatoma AS-30D se realizó mediante la técnica propuesta por Moreadith y Fiskum [117] con modificaciones realizadas en este laboratorio (Apéndice A).

1.3.3.Medición del control respiratorio:

La medición del control respiratorio (apéndice B) se realizó mediante un método polarográfico [6] utilizando un oxímetro marca YSI, modelo 53, y un electrodo de oxígeno de la misma marca.

Todas las mediciones se realizaron a 30°C preincubando 5 minutos en 1.8ml de medio KME (apéndice H), 3mM de P_i y los respectivos sustratos, el estado 3 de la respiración se estimuló agregando ADP.

1.3.4. Evaluación cuantitativa de los C_i :

La medición de los C_i se realizó mediante el método de inhibición específica propuesto por Westerhoff y Tager [70-72,80,91] utilizando los siguientes inhibidores:

| Inhibidor | Marca | Conc. Sol. stock. (μ M) | Disolvente |
|--------------------------------------|-------|------------------------------|---------------------------|
| Carboxiatractilósido | SIGMA | 100 | Agua. |
| Oligomicina | SIGMA | 50 | Dimetil-sulfóxido (DMSO). |
| Antimicina | SIGMA | 500 | DMSO. |
| Rotenona | SIGMA | 1500 | DMSO. |
| Cianuro de potasio | SIGMA | 10^5 | Agua. |
| Mersalil | CNN | 10^5 | Agua/Tris. |
| α -ciano-4-hidroxi-cianamato. | CNN | 10^5 | Agua. |
| CCCP | SIGMA | 2000 | DMSO. |

El valor de C_i para la permeabilidad pasiva a los protones en estado 4 se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Groen [81] utilizando CCCP para estimular la respiración en estado 4 (apéndice C).

1.3.5. Medición de la cantidad de proteína mitocondrial:

La cantidad de proteína mitocondrial para todos los casos fue realizada mediante la técnica de biuret [134], utilizando un estándar de albúmina sérica bovina, desoxicolato de sodio al 1% (p/v) y muestras de 10 y 20 μ l de la preparación mitocondrial obtenida.

1.3.6. Medición del potencial transmembranal ($\Delta\phi$):

La técnica seleccionada para la estimación del $\Delta\phi$ en mitocondrias de hepatoma fue la reportada por Rottenberg [120], utilizando como marcador TPP (tetrafenil-fosfonio) tritiado (apéndice D).

Los materiales y métodos empleados para el estudio realizado en mitocondrias de corazón fue la siguiente:

1.3.7. Obtención de mitocondrias de corazón:

Para la obtención de estas mitocondrias se empleó el método propuesto por Moreno-Sánchez [126] (apéndice E) partiendo de corazones de rata macho de la cepa *Wistar* con pesos comprendidos entre 250-300g, utilizando para la mejor homogenización del tejido NAGARSE (proteasa cristalizada y liofilizada de proteínas bacterianas).

1.3.8. Medición de la concentración de Ca^{2+} externo $[Ca^{2+}]_o$ y la concentración de Ca^{2+} intramitocondrial $[Ca^{2+}]_m$:

Para la estimación cuantitativa de las concentraciones de Ca^{2+} intra y extramitocondrial se utilizó el indicador fluorescente para Ca^{2+} de tercera generación denominado como Fluo-3AM el cual es un éster que puede ingresar a la matriz mitocondrial y sufrir hidrólisis por esterasas mitocondriales para dar su forma activa que le permite quelar Ca^{2+} y fluorecer [119]. Para la internalización del indicador se incubaron a las mitocondrias con $5\mu M$ del éster durante 30 minutos a $25^\circ C$, con posterior centrifugación y lavado para eliminar el indicador que no se internalizó.

1.3.9. Control de las concentraciones de $[Ca^{2+}]_m$:

Las concentraciones de Ca^{2+} se controlaron mediante el empleo de amortiguadores de Ca^{2+} /EGTA de acuerdo a lo propuesto por Fabiato [136,137] y Moreno-Sánchez y cols., [119] (apéndice F).

Capítulo IV.

1.4.Resultados

1.4.1.Control de la fosforilación oxidativa:

Como ya he mencionado, para este estudio se emplearon como modelo las mitocondrias de células tumorales. En todos los casos se utilizaron mitocondrias acopladas cuyos controles respiratorios fluctuaban entre 5 y 10, de tal forma que con ello se garantiza la calidad de la preparación mitocondrial.

Se analizó la distribución del control a nivel de la fosforilación oxidativa en tres sistemas diferentes con el objetivo de observar también la contribución de las deshidrogenasas del Ciclo de Krebs:

- a. Piruvato/Malato.
- b. Glutamato/Malato.
- c. Succinato/rotenona.

Inicialmente se estimaron los controles respiratorios y las diferentes relaciones ADP/O para cada sistema, (Tabla II); las relaciones ADP/O indican el número de ATPs sintetizados por cada μmol de oxígeno ($\mu\text{mol O}_2$) que es consumido por la preparación mitocondrial, de tal forma que se puede tener una excelente idea de la capacidad fosforilante mitocondrial para cada uno de los sistemas empleados.

Tabla II. Relación ADP/O y controles respiratorios obtenidos en mitocondrias de hepatoma AS-30D.

| Sistema: | Flujo. edo.3. | CR | ADP/O | n |
|-------------------------|------------------------------|---------|---------|----|
| | (ngatO ₂ /mg*min) | | | |
| | X ± S | X ± S | X ± S | |
| Piruvato/ Malato. | 82±12 | 7.4±0.8 | 3.2±0.4 | 10 |
| Glutamato/ Malato. | 96±08 | 9.5±0.5 | 4.1±0.5 | 10 |
| Succinato/ Rotenona. | 127±21 | 6.0±0.7 | 1.3±0.2 | 10 |

Las mitocondrias (2mg) fueron incubadas en 1.8ml de medio KME, suplementado con 3mM. de P_i, y los respectivos sustratos: 5mM de piruvato, 3mM de malato, 9.5mM de glutamato o 10mM de succinato más 1.5μM de rotenona pH 7.2, a 30°C. Después de 5 minutos. La respiración fue estimulada adicionando 1.6μmoles de ADP.

El siguiente paso fue evaluar la distribución de control de cada sistema utilizando la Teoría de control metabólico, y específicamente el método de inhibición específica [71]. Existen diversos reportes acerca de la distribución de control en esta vía y en todos los estudios realizados [89-98] quienes ejercen el mayor grado de control son: La translocasa de AdN, la citocromo-oxidasa, y el acarreador de dicarboxilatos. Además se ha observado que la distribución de control varía de acuerdo a las condiciones en que se encuentra el sistema, pero las enzimas mencionadas, independientemente de las condiciones, siempre aparecen con los valores más elevados de C_i , por lo tanto se encuentran ejerciendo el mayor control de la vía. También se ha visto que en ninguno de los tejidos hasta ahora estudiados (corazón, riñón, hígado y levadura) [91,97,98,138] existe un sólo punto de control, ya que siempre se distribuye a lo largo de todas las enzimas que integran la ruta metabólica.

La evaluación cuantitativa de los C_i se realizó a nivel de las siguientes enzimas: Sitio I, Complejo b- c_1 , ATP-sintetasa, Translocasa de AdN, Acarreador de fosfatos, Citocromo-oxidasa, Acarreador de piruvato y permeabilidad pasiva a protones en estado 4, y para cada sistema se incluyó una medición del potencial

transmembranal ($\Delta\phi$). Las curvas de titulación obtenidas para el sistema piruvato/malato se muestran en la figura 7.

La evaluación de los C_i se realizó mediante las ecuaciones descritas por Westerhoff y Tager [71,72,75], y observando la figura 7 por simple inspección de gráficas se puede deducir que las únicas enzimas candidatas a ejercer el control en este sistema son la citocromo-oxidasa, la translocasa de AdN y la ATP-sintetasa; pero para un mejor análisis lo más adecuado es evaluar los C_i , que para el sistema de piruvato/malato se muestran en la Tabla III. Analizando la Tabla III se puede observar que los C_i del acarreador de fosfatos, complejo b- C_1 , acarreador de piruvato, y sitio I poseen un valor de cero, lo cual era evidente desde las curvas de titulación obtenidas ya que su pendiente inicial es cero. Por otra parte también era evidente que el control iba a recaer sobre la citocromo-oxidasa, ATP-sintetasa, y Acarreador de AdN debido a que eran las únicas curvas de titulación con pendientes diferentes a cero.

Con glutamato y malato se esperaban resultados diferentes en el control de la vía debido a los reportes previos [104-107] de las alteraciones en las rutas de oxidación a nivel mitocondrial en hepatoma y, además, porque precisamente la PDH y α -CGDH estaban

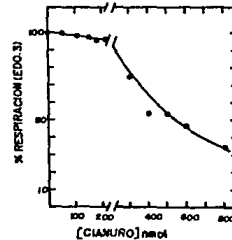
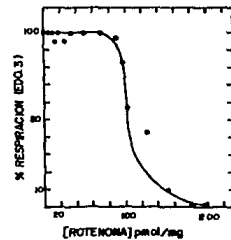
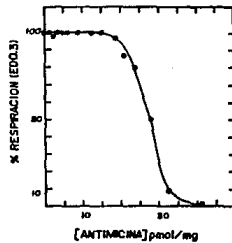
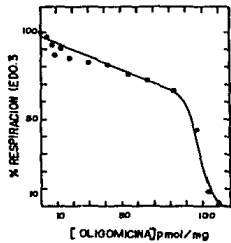
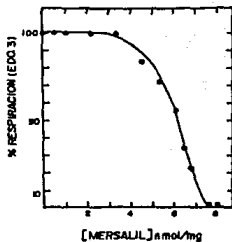
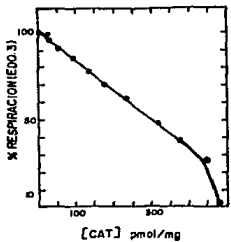


Figura 7. Titulación de las diferentes etapas que integran la fosforilación oxidativa en mitocondrias de hepatoma utilizando el sistema piruvato (5mM) / malato (3mM), las mitocondrias fueron incubadas en 1.8ml de medio KME, adicionado con 3mM de P_i, pH 7.2, a 30°C durante 5min y 100% de O₂. La respiración en estado 3 fue estimulada adicionando ADP.

Tabla.III. Coeficientes de control de flujo obtenidos de titular mitocondrias acopladas de hepatoma, para el sistema piruvato/malato.

| Enzima (s). | Estado.3. | | Estado.4. | | Inhibidor | |
|--------------------------------|----------------|-----|----------------|-----|-----------------------|-----|
| | C _i | | C _i | | | |
| | X ± S | n | X±S | n | | |
| Acarreador de ATP/ADP. | 0.69±0.02 | (5) | 0±0 | (7) | CAT | (I) |
| ATP-sintetasa. | 0.32±0.06 | (5) | 0±0 | (7) | Oligomicina | (I) |
| Acarreador de P _i . | 0.00±0.0 | (3) | 0±0 | (4) | Mersalil | (I) |
| Sitio I. | 0.00±0.0 | (3) | 0±0 | (4) | Rotenona | (I) |
| Sitio II. | 0.00±0.0 | (3) | 0±0 | (4) | Antimicina | (I) |
| Citocromo-oxidasa. | 0.02±0.001 | (3) | 0±0 | (3) | Cianuro* | (N) |
| Acarreador de piruvato. | 0.00±0.0 | (3) | 0±0 | (3) | α-CN-4-OH- cianamato. | (N) |
| Permeabilidad a H ⁺ | ----- | | 0.83±0.05 | (3) | CCCP | (D) |
| EC _i | 1.03 | | 0.83 | | | |
| Δφ | -150.02±2mv | (3) | | | | |

(I): Irreversible. (N): No competitivo. (D): Desacoplante. *K_i = 16μM.

involucradas en estas alteraciones metabólicas. Las curvas de titulación con glutamato se muestran en la figura 8; es evidente que las únicas enzimas con posible control en la fosforilación oxidativa son las mismas que para el caso del sistema con piruvato y malato.

Observando la Tabla IV, es obvio que las únicas enzimas que controlan el flujo en este sistema son: Acarreador de AdN, ATP-sintetasa y Citocromo-oxidasa, las cuales prácticamente muestran los mismos valores de C_i que en el caso anterior. Después de esto sólo quedaba caracterizar a el sistema succinato/rotenona para ver si encontrábamos alguna diferencia en la distribución de control comparada con la obtenida de los casos anteriores.

Las curvas de titulación obtenidas para este caso se muestran en la figura 9, y los valores de C_i en la Tabla V.

Al igual que los casos anteriores, se puede observar que solamente tres enzimas muestran una pendiente que denota la posibilidad de que éstas puedan ejercer diversos grados de control a nivel de la ruta de fosforilación oxidativa cuando el sistema es alimentado por la oxidación de succinato. Esto es más evidente al observar los valores obtenidos para cada uno de los C_i ; en este caso tampoco se observan grandes

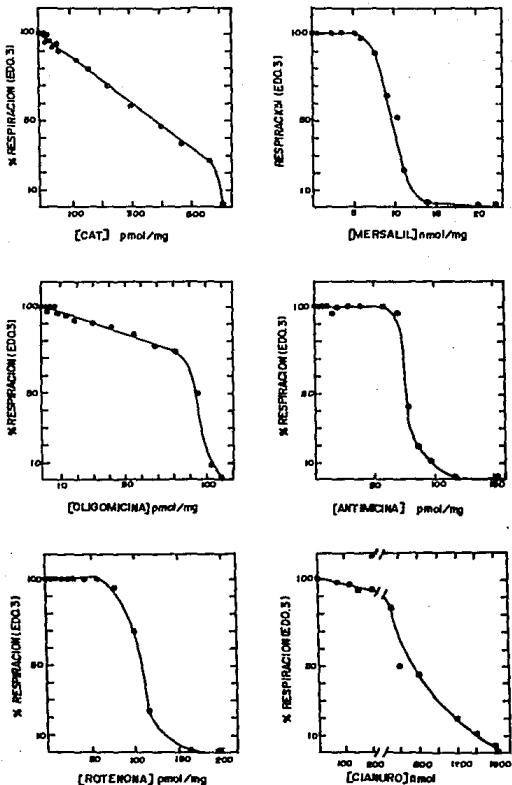


Figura 8. Titulación de las diferentes etapas que integran la fosforilación oxidativa en mitocondrias de hepatoma utilizando el sistema glutamato (9.5mM) / malato (3mM), las mitocondrias fueron incubadas en 1.8ml de medio KNE, adicionado con 3mM de P_i , pH 7.2, a 30°C durante 5min y 100% de O_2 . La respiración en estado 3 fue estimulada adicionando ADP.

Tabla.IV. Coeficientes de control de flujo obtenidos de titular mitocondrias acopladas de hepatoma, para el sistema: glutamato/malato.

| Enzima (s). | Estado.3. | | Estado.4. | | Inhibidor. | |
|----------------------------------|----------------|-----|----------------|-----|-------------|-----|
| | C _i | | C _i | | | |
| | X ± S | n | X±S | n | | |
| Acarreador de ATP/ADP. | 0.70±.03 | (5) | 0±0 | (7) | CAT | (I) |
| ATP-sintetasa | 0.28±.08 | (5) | 0±0 | (7) | Oligomicina | (I) |
| Acarreador de P _i . | 0.00±0.0 | (3) | 0±0 | (3) | Mersalil | (I) |
| Sitio I. | 0.00±0.0 | (4) | 0±0 | (4) | Rotenona | (I) |
| Sitio II. | 0.00±0.0 | (4) | 0±0 | (5) | Antimicina | (I) |
| Citocromo-oxidasa. | 0.04±.003 | (3) | 0±0 | (3) | Cianuro* | (N) |
| Permeabilidad a H ⁺ . | ----- | | 0.79±.02 | (3) | CCCP | (D) |
| ΣC _i | 1.02 | | 0.79 | | | |
| Δ _o | -149.6±3mv | (3) | | | | |

* K_i = 16μM

(I): Irreversible.

(N): No competitivo.

(D): Desacoplante.

variaciones en los valores de C_i , ya que las enzimas que controlan el flujo para este sistema son: El acarreador de AdN, ATP-sintetasa y citocromo-oxidasa, mostrando prácticamente los mismos valores para los coeficientes de control.

Caracterizado el sistema en condiciones "normales" lo que se tenía que investigar era el efecto del Ca^{2+} a nivel de esta ruta y de deshidrogenasas de ciclo-TCA. Para ello se incubaron a las mitocondrias en las mismas condiciones con menor cantidad de sustrato y 3min antes de la adición de ADP se agregaban diferentes concentraciones de Ca^{2+} mediante el empleo de amortiguadores de Ca^{2+} /EGTA.

Se esperaba tener una estimulación por Ca^{2+} bien definida en los sistemas de piruvato/malato y glutamato/malato debido a el reporte previo de Murphy [114] realizado precisamente en esta línea celular, por lo que se probó en nuestras condiciones. A diferencia de los resultados obtenidos por este grupo nosotros no pudimos lograr una activación constante por el Ca^{2+} en las mitocondrias, aun más, si se utilizaban las concentraciones de Ca^{2+} reportadas en dicho trabajo sólo se lograba que las mitocondrias se desacoplaran completamente y a menores concentraciones disminuía el control respiratorio, indicando que solamente se estaba dañando a la preparación mitocondrial. Esto fue

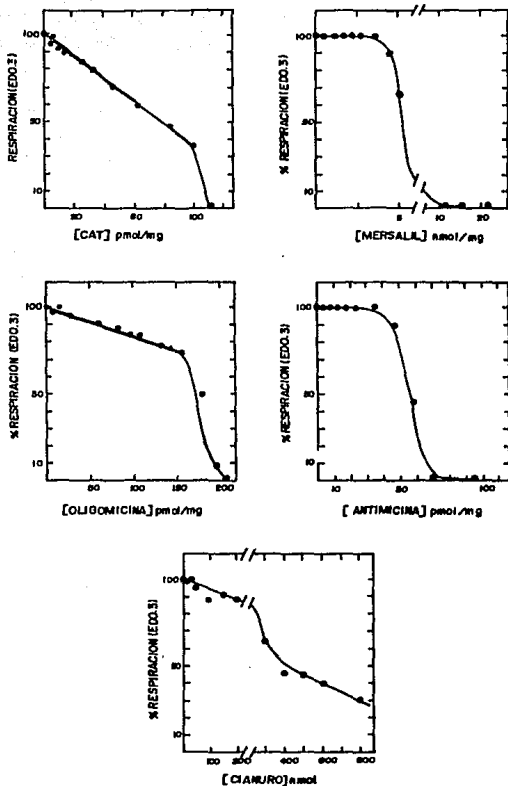


Figura 9. Titulación de las diferentes etapas que integran la fosforilación oxidativa en mitocondrias de hepatoma utilizando el sistema succinato (10mM) / rotenona (1.5mM). Las mitocondrias fueron incubadas en 1.5ml de medio KME, adicionado con 3mM de P_i, pH 7.2, a 30°C durante 5min y 100% de O₂. La respiración en estado 3 fue estimulada adicionando ADP.

Tabla.V. Coeficientes de control de flujo obtenidos de titular mitocondrias acopladas de hepatoma para el sistema: succinato/rotenona.

| Enzima (s). | Estado.3. | | Estado.4. | | Inhibidor. | |
|----------------------------------|----------------|-----|----------------|-----|----------------|-----|
| | C _i | | C _i | | | |
| | X ± S | n | X±S | n | | |
| Acarreador de ATP/ADP. | 0.69±0.03 | (5) | 0±0 | (5) | CAT | (I) |
| ATP-sintetasa. | 0.19±0.05 | (5) | 0±0 | (5) | Oligomicina(I) | |
| Acarreador de P _i . | 0.00±0.0 | (3) | 0±0 | (3) | Mersalil | (I) |
| Sitio II. | 0.00±0.0 | (4) | 0±0 | (4) | Antimicina | (I) |
| Citocromo-oxidasa. | 0.03±0.001 | (3) | 0±0 | (3) | Cianuro* | (N) |
| Permeabilidad a H ⁺ . | ----- | | 0.97±0.2 | (3) | CCCP | (D) |
| ΣC _i | 0.91 | | 0.97 | | | |
| Δφ | -152.02±3mv | (3) | | | | |

* K_i = 16μM.

(I): Irreversible.

(N): No competitivo.

(D): Desacoplante.

consistente a temperatura de 30°C, 35°C y 37°C, en presencia y en ausencia de Mg^{2+} .

En el caso de inhibidores de tipo irreversible, como la cantidad utilizada de ellos es directamente proporcional a la cantidad de enzima y, por lo tanto, cuando se logra un flujo de cero se tiene que todo el inhibidor empleado se ha unido a toda la enzima presente en la preparación, se pudieron medir la concentración de algunas de las enzimas que se involucran en la vía de fosforilación oxidativa, las cuales se muestran en la Tabla VI.

Las cantidades encontradas en cada caso son equivalentes a lo que se reporta para mitocondrias de hígado [138].

1.4.2. Transporte de Ca^{2+} mitocondrial:

El estudio a nivel de transporte de Ca^{2+} se realizó utilizando como modelo mitocondrias de corazón debido a que son las mejor caracterizadas en cuanto a este proceso se refiere. La investigación de este proceso se dividió en tres partes: La primera de ellas abarca la evaluación cuantitativa del intercambiador Na^+/Ca^{2+} en la determinación de la $[Ca^{2+}]_m$, la segunda parte abarca el estudio de la contribución del intercambiador H^+/Ca^{2+} en el mismo proceso y por último la contribución de otros mecanismos de salida de Ca^{2+} no muy bien caracterizados hasta el momento.

Tabla.VI. Concentraciones de algunas enzimas que integran la fosforilación oxidativa en mitocondrias de hepatoma obtenidas a partir de la titulación con los correspondientes inhibidores irreversibles: CAT para el acarreador de AdN, Oligomicina para la ATP-sintetasa, Mersalil para el acarreador de P_i , Rotenona para el sitio I, y Antimicina para el sitio II.

| Enzima (s). | Concentración. | | | n |
|------------------------|----------------|--------|--|------|
| | (pmol/mg). | | | |
| | X | ± S | | |
| Acarreador de ATP/ADP. | 452 | ± 7.0 | | (10) |
| ATP-sintetasa. | 133 | ± 26.0 | | (10) |
| Acarreador de P_i .* | 9 | ± 1.0 | | (8) |
| Sitio I. | 117 | ± 38.0 | | (8) |
| Sitio II. | 103 | ± 16.0 | | (8) |

* (nmol/mg).

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en mitocondrias de corazón y, generalmente de tejidos excitables, se reporta como el más activo de los tres existentes en estas mitocondrias [7,11] y todos los estudios realizados a este nivel se han realizado con técnicas poco sensibles para la cantidad de Ca^{2+} que se tiene en la matriz mitocondrial [7,15], por ello decidimos evaluar diversos aspectos que involucran a este intercambiador utilizando uno de los métodos más sensibles que se han descrito para la evaluación de la concentración interna de Ca^{2+} , éste consiste en utilizar a el indicador fluorescente para Ca^{2+} de tercera generación denominado como Fluo-3AM.

La internalización del indicador se logra incubando las mitocondrias con la forma de acetometilester del indicador. Las condiciones de incubación empleadas fueron las establecidas por Moreno-Sánchez y cols. [119], en las cuáles la preparación mitocondrial (1ml) se incuba con 1ml de medio SHEA (apéndice G), $5\mu\text{M}$ de el indicador fluorescente Fluo-3AM, en presencia de 1mM de ADP y 1mM de Mg^{2+} durante 30min en agitación, a 25°C para el caso de mitocondrias de corazón.

Es importante mencionar que en todos los casos el control respiratorio de la preparación permaneció constante después de la incubación.

El tiempo de incubación para la total hidrólisis del éster se determinó realizando diferentes espectros de emisión en diversos intervalos de tiempo durante la incubación de la preparación mitocondrial a los: 0 min, 10 min, 20 min y 30 min, de la misma forma se determinó la longitud de onda de emisión a la cual se iba a realizar la medición de la concentración interna de Ca^{2+} y la calibración de la señal de todos los experimentos (figura 10).

La forma hidrolizada del indicador fluorescente le permite quelar calcio en el interior de la matriz mitocondrial debido a que al hidrolizarse adquiere cuatro "brazos" con extremos carboxilos libres semejantes al EGTA, los cuáles le permiten unir Ca^{2+} de manera semejante a este último (figura 11), pero a diferencia de éste los indicadores emiten una señal fluorescente que permite medir la fluorescencia interna que se traduce como $[\text{Ca}^{2+}]_m$, todo ello con una correcta calibración de la señal.

La calibración de la señal requiere del establecimiento de una fluorescencia mínima (F_{\min}), y una máxima (F_{\max}) de tal forma que se pueda utilizar la siguiente fórmula [119]:

$$[\text{Ca}^{2+}]_m = K_d (F_x - F_{\min}) / (F_{\max} - F_x)$$

Para obtener F_{\min} se permeabilizan las mitocondrias adicionando Tris, desoxicolato de sodio y

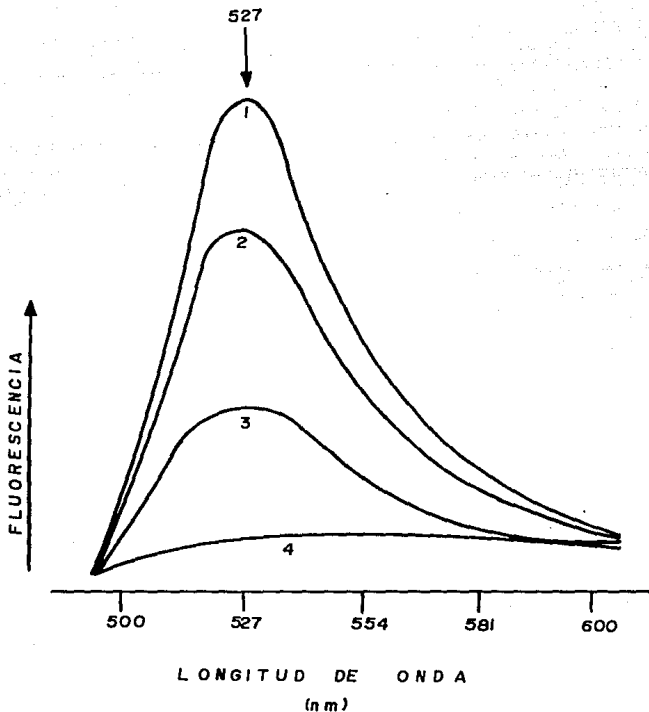


Figura 10. Espectros de emisión del indicador Fluo-3 a diferentes tiempos de incubación utilizando mitocondrias de corazón incubadas en un medio que contenía : 250mM Sacarosa, 5mM HEPES, 1mM EGTA, 0.5% (p/v) ASB; a 25°C en agitación y 100% de O₂. Utilizando una longitud de onda de excitación de 500nm. (1) 30min. (2) 20min. (3) 10min. (4) control sin indicador.

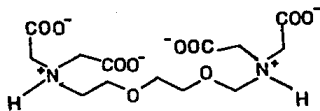
para apagar la fluorescencia EGTA, el cual tiene mayor afinidad por el Ca^{2+} y puede competir efectivamente con el Fluo-3 por el catión, ejemplo (figura 12):

El valor correspondiente a F_{max} se puede determinar adicionando un exceso de Ca^{2+} a la preparación lisada, con ello se puede calcular el valor de $[\text{Ca}^{2+}]_m$ utilizando un valor de K_d para el complejo Fluo-Ca de 400mM [123].

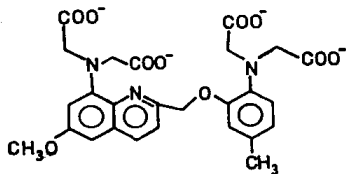
Todas las preparaciones mitocondriales empleadas para este estudio poseían CR que fluctuaban entre 5-12, y su capacidad para acumular Ca^{2+} se mantenía durante 9hrs. (no se manejaron tiempos mayores).

1.4.2.1. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$:

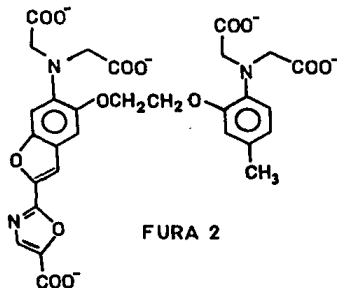
El primer aspecto en ser evaluado fue la influencia que tiene el potasio sobre el influjo y eflujo de Ca^{2+} . Para ello se incubaron diferentes preparaciones mitocondriales en dos medios, uno básicamente constituido por potasio y otro con sacarosa para mantener las condiciones de osmolaridad; después de ello se exponían a las mitocondrias a diferentes concentraciones de Ca^{2+} y se iniciaba la salida de Ca^{2+} con una misma concentración de Na^+ (10mM). Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 13 y 14, en donde se observa que las cinéticas exhiben el mismo comportamiento, ya que son prácticamente iguales en presencia o ausencia de



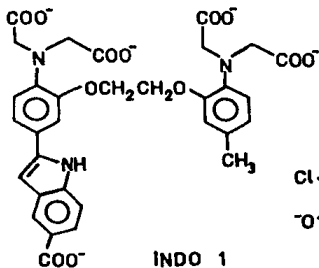
EGTA



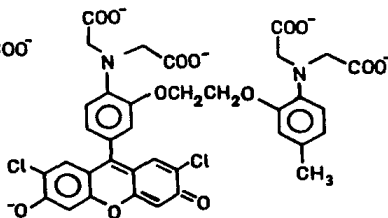
QUIN 2



FURA 2



INDO 1



FLUO 3

Figura 11. Estructuras químicas del EGTA y de los indicadores fluorescentes para Ca^{2+} de primera, segunda y tercera generación.

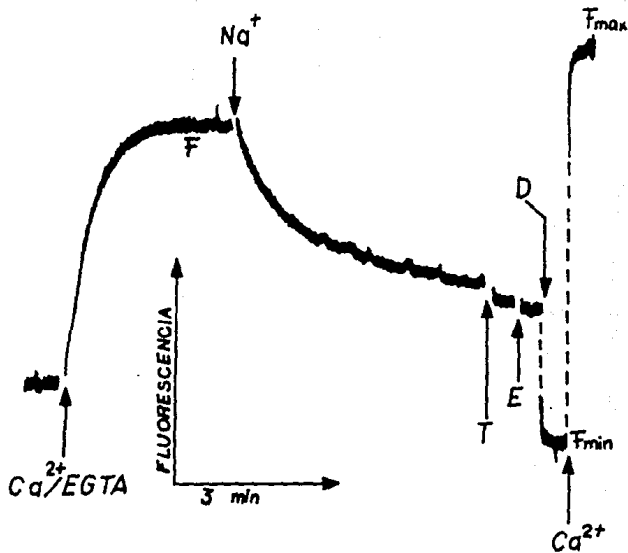


Figura 12. Calibración de la señal de fluorescencia. Las mitocondrias fueron incubadas en medio KME, a 25°, en agitación y 100% de O₂, utilizando como sustrato el sistema succinato/rotenona, se adicionó Ca²⁺/EGTA, el influjo se indujo con Na⁺, y la calibración se realiza mediante la obtención de una fluorescencia máxima (F_{max}) y una mínima (F_{min}), utilizando EGTA (E), Tris (T), y Desoxicolato de Na⁺ (D).

potasio. La diferencia fundamental existe en la velocidad de influjo y eflujo, evidente en la parte superior de ambas figuras.

Para corroborar los estudios realizados con Na^+ , se empleó un catión químicamente muy semejante para inducir el eflujo, éste fue el caso del Li^+ . La cinética obtenida empleándolo en las mismas condiciones que el Na^+ se muestra en la figura 15; observando la cinética obtenida para el caso del Li^+ y comparándola con la del Na^+ es notable que existe una gran diferencia en la potencia del catión para inducir el eflujo del Ca^{2+} (menor en el caso del Li^+).

Para evitar la interferencia de la entrada de Ca^{2+} se añadió rojo de rutenio y así poder medir la actividad neta del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en presencia y en ausencia de potasio. Los resultados obtenidos para este caso fueron los que se muestran en las figuras 16 y 17. Se puede observar que en presencia de potasio (figura 14), la concentración de Ca^{2+} mitocondrial se mantuvo por abajo de 100nM hasta una concentración de Ca^{2+} externo de 400nM, mientras que en ausencia de potasio (figura 13) la concentración de Ca^{2+} mitocondrial fue 100nM con concentración de Ca^{2+} extramitocondrial de 100nM. Esto se explica por la activación del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ por K^+ , reportado previamente en condiciones no fisiológicas [38].

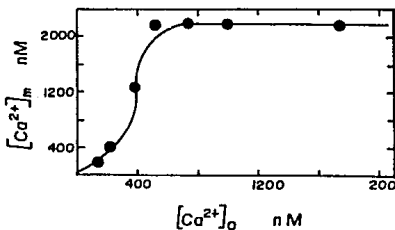
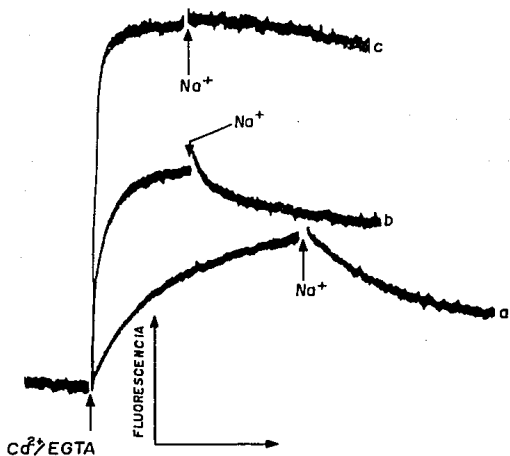


Figura 13. Inhibición del eflujo de Ca^{2+} inducido por Na^+ utilizando concentraciones crecientes de Ca^{2+} externo en mitocondrias de corazón. (a) 132nM. (b) 380nM. (c) 500nM de Ca^{2+} . Las mitocondrias fueron incubadas en un medio que contenía: 250mM Sacarosa, 5mM de HEPES, 1mM EGTA; a 25°C durante 5min en agitación y 100l de O_2 . (Figura representativa de 5 preparaciones mitocondriales diferentes). La gráfica muestra la relación $[Ca^{2+}]_o$ vs $[Ca^{2+}]_m$ obtenida después de añadir NaCl y alcanzar el estado estacionario (6min).

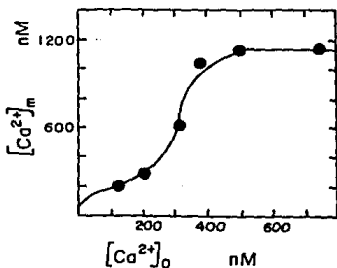
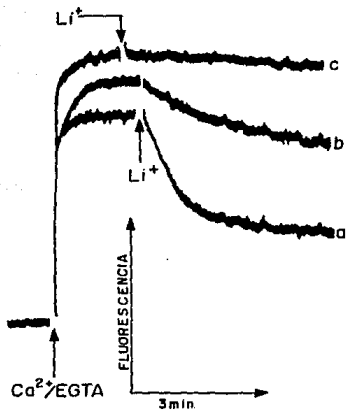


Figura 15. Inhibición del eflujo de Ca^{2+} inducido por Li^+ utilizando concentraciones crecientes de Ca^{2+} externo, en mitocondrias de corazón. (a) 132nM. (b) 380nM. (c) 700nM de Ca^{2+} . Las mitocondrias se incubaron en un medio que contenía: 120mM KCl, 20mM MOPS, 1mM EGTA, a 25°C durante 5min en agitación y 100% de O_2 . (Figura representativa de 3 preparaciones mitocondriales diferentes). La gráfica muestra la relación $[\text{Ca}^{2+}]_o$ vs $[\text{Ca}^{2+}]_m$ obtenida después de añadir LiCl y alcanzar el estado estacionario (6min).

La actividad de los sistemas de influjo y eflujo de Ca^{2+} de las mitocondrias *in vivo* están sujetos a la acción de diversos factores, de todos ellos los de mayor impacto para los sistemas de influjo y eflujo estudiados son: El P_i , el Mg^{2+} y la espermina, los dos primeros tienen la capacidad de inhibir el influjo de Ca^{2+} y la espermina tiene la capacidad de activarlo [51], es por ello que, para estudiar estos mecanismos en condiciones lo más cercanas a las fisiológicas, se realizaron los experimentos de eflujo en presencia de P_i , Mg^{2+} , espermina y K^+ .

Los resultados en estas condiciones se muestran en las figuras 14, 16 y 17; se puede observar que en ausencia de RR los niveles de Ca^{2+} mitocondrial obtenidos son prácticamente iguales a las realizadas en ausencia de estos factores; mientras que en presencia de RR ésta muestra un comportamiento más limitante aunque se observan pequeñas inhibiciones del eflujo en rangos de Ca^{2+} considerados como fisiológicos. Lo anterior soporta el hecho de que en condiciones cercanas a las fisiológicas el gradiente mitocondrial se encuentra invertido.

1.4.2.2. Intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$:

Para la evaluación de este intercambiador se recurrió a el empleo de un inhibidor del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [7,32-36] el seleccionado en nuestro caso fue

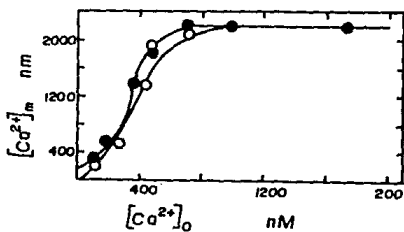
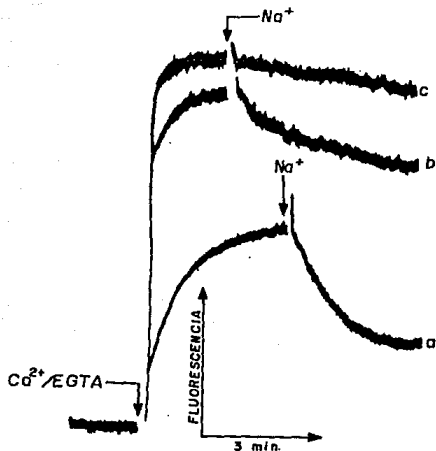


Figura 14. Inhibición del eflujo de Ca^{2+} inducido por Na^+ utilizando concentraciones crecientes de Ca^{2+} externo en mitocondrias de corazón. \circ En ausencia de P_i , espermina y Mg^{2+} , \bullet En presencia de $1mM$ de P_i , $5mM$ de Mg^{2+} , y $1000mM$ de espermina. (a) $132nM$. (b) $180nM$. (c) $500nM$ de Ca^{2+} . Las mitocondrias se incubaron en un medio que contenía: $120mM$ KCl, $20mM$ MOPS, $1mM$ DTP, a $25^\circ C$ durante 5min en agitación y 100% de O_2 . (Figura representativa de 5 preparaciones mitocondriales diferentes). La gráfica muestra la relación $[Ca^{2+}]_o$ vs $[Ca^{2+}]_i$ obtenida después de añadir NaCl y alcanzar el estado estacionario (5min).

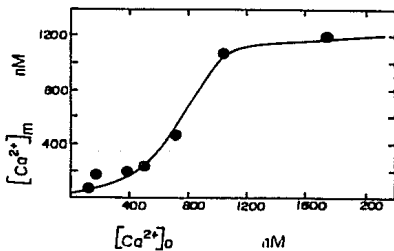
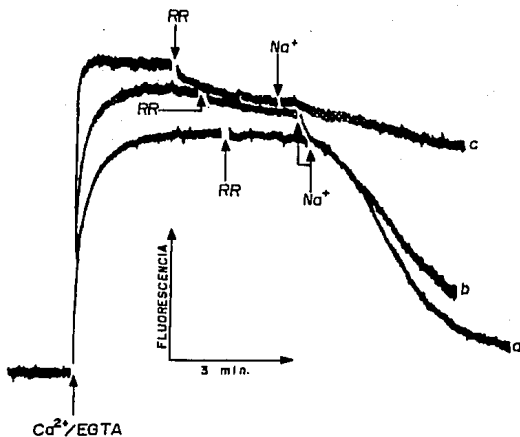


Figura 16. Inhibición del flujo de Ca^{2+} inducido por Na^+ /Rojo de rutenio (RR), utilizando concentraciones crecientes de Ca^{2+} externo en mitocondrias de corazón. (a) 132nM. (b) 380nM. (c) 1500nM de Ca^{2+} . Las mitocondrias fueron incubadas en un medio que contenía: 250mM Sacarosa, 5mM HEPES, 1mM EGTA; a 25°C durante 5min en agitación y 100% de O_2 . (Figura representativa de 3 preparaciones mitocondriales diferentes). La gráfica muestra la relación $[Ca^{2+}]_o$ vs $[Ca^{2+}]_i$ obtenida después de añadir NaCl y alcanzar el estado estacionario (6min).

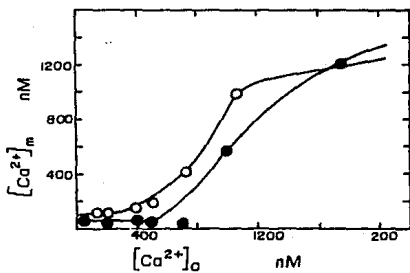
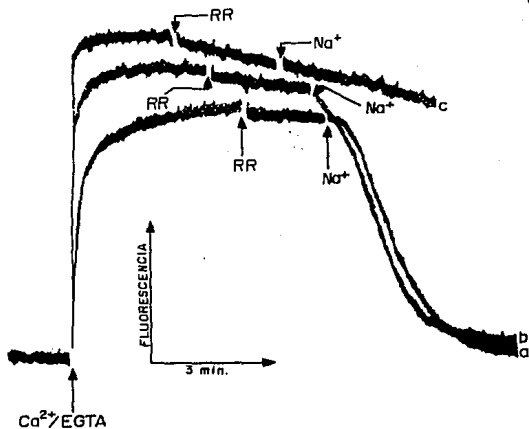


Figura 17. Inhibición del eflujo de Ca^{2+} inducido por Na^+ /Rajo de ruthenio (RR) , utilizando concentraciones crecientes de Ca^{2+} externo en mitocondrias de corazón. # En ausencia de P_i , Mg^{2+} y espermina, o (o) En presencia de 3mM de P_i , 5mM de Mg^{2+} y 100mM de espermina. (a) 132nM . (b) 380nM . (c) 1500nM de Ca^{2+} . Las mitocondrias se incubaron en un medio que contenía: 120mM KCl, 20mM MOPS, 1mM EGTA; a 25°C durante 3min en agitación y 100% de O_2 . (Figura representativa de 3 preparaciones mitocondriales diferentes) La gráfica muestra la relación $[\text{Ca}^{2+}]_o$ vs $[\text{Ca}^{2+}]_m$ obtenida después de añadir NaCl y alcanzar el estado estacionario (6min).

el diltiazem (dil). Los experimentos consistieron en exponer a las mitocondrias a una concentración de Ca^{2+} en la cual el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pudiera tener actividad máxima (provocar un eflujo completo de Ca^{2+}) y entonces inhibir este eflujo con diferentes concentraciones de diltiazem para obtener un valor de K_i y compararla con las reportadas en la literatura.

La primera detrmínación de K_i para dil. se realizó en presencia de K^+ , y el influjo se realizó con Li^+ retando cada vez con una concentración final del catión de 10mM. La cinética obtenida se muestra en la figura 18, obteniendo un valor de K_i de aproximadamente $350\mu\text{M}$; el siguiente ensayo se realizó con Na^+ y también en presencia de K^+ , la cinética se muestra en la figura 19, de ésta es evidente que se tiene una K_i aproximada de 350mM, que es 1000 veces mayor que la obtenida para Li^+ ; por último, para volver al sistema más limitante, se empleó RR para inhibir el influjo de Ca^{2+} y estudiar exclusivamente la contribución de los intercambiadores, la cinética que se obtuvo para este caso se muestra en la figura 20, de la cual se obtiene un valor de K_i aproximado de $700\mu\text{M}$, en los tres casos los valores de K_i son superiores a los reportados en la literatura [45].

Finalizada la evaluación de los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ la único que quedaba por hacer fue

la evaluación de la contribución de los mecanismos de eflujo no bien caracterizados.

1.4.2.3. Otros mecanismos de eflujo de Ca^{2+} :

Existen dos propuestas de mecanismos que involucran eflujos de Ca^{2+} diferentes a los intercambiadores estudiados y que no guardan relación directa con estos últimos. Los mecanismos propuestos son: Un poro de salida de Ca^{2+} sensible a ciclosporina [51,65-69,132,133] y; un aparente cambio de permeabilidad de la membrana mitocondrial que involucra a la fosfolipasa A_2 [56,57].

La estrategia para el estudio de estos mecanismos fue ideada apartir de un estudio de Rottenberg y Marbach [51], en donde se observa que el etanol (et-OH) es capaz de activar el eflujo de Ca^{2+} inducido por Na^+ en condiciones no fisiológicas. Nosotros decidimos probarlo en nuestras condiciones y observar la estimulación del eflujo inducida por Na^+ , Li^+ , y RR. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 21, en donde se tiene una aparente estimulación del eflujo de Ca^{2+} inducido por Na^+ (círculos oscuros), la cual es igual al inducido por Li^+ (cuadros oscuros), y el eflujo también se observó en presencia exclusiva de RR (círculos vacíos), lo que podría involucrar una estimulación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ por et-OH en condiciones cercanas a las fisiológicas.

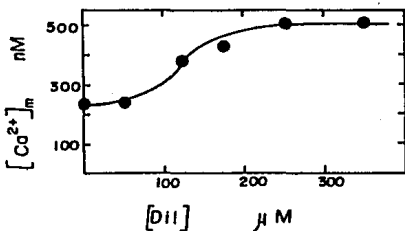
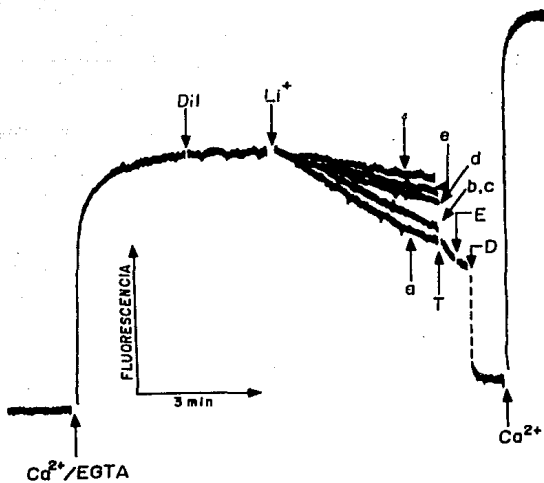


Figura 18. Inhibición por Diltiazem (Dil), del eflujo de Ca^{2+} inducido por Li^+ , utilizando una concentración fija de Ca^{2+} externo de $0.131\mu\text{M}$ en mitocondrias de corazón. (a) No Dil. (b) $60\mu\text{M}$. (c) $130\mu\text{M}$. (d) $180\mu\text{M}$. (e) $250\mu\text{M}$. (f) $350\mu\text{M}$. Mitocondrias incubadas en KME, durante 5 min, y 100% de O_2 . (T: Tris, E: EGTA, D: Desoxicolato). (Figura representativa de 3 preparaciones mitocondriales diferentes)

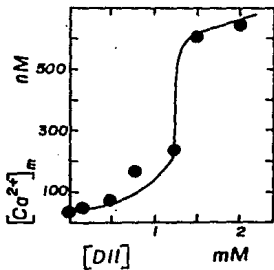
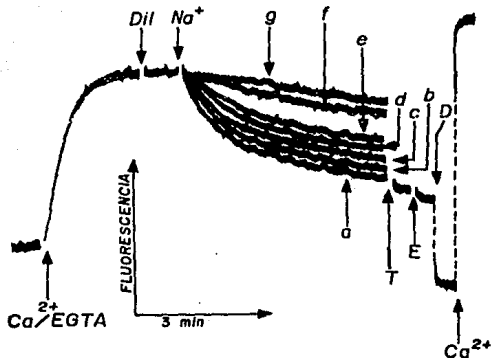


Figura 19. Inhibición por Diltiazem (Dil), del eflujo de Ca^{2+} inducido por Na^+ , utilizando una concentración fija de Ca^{2+} externo de $0.131\mu\text{M}$ en mitocondrias de corazón. (a) No Dil, 0.062mM . (b) 0.125mM . (c) 0.5mM . (d) 0.75mM . (e) 1.25mM . (f) 1.5mM . (g) 2mM . Mitocondrias incubadas en KHE, durante 5min y $100\mu\text{l}$ de O_2 . (T: Tris, E: EGTA, D: Desoxicolato). (Figura representativa de 3 preparaciones mitocondriales diferentes)

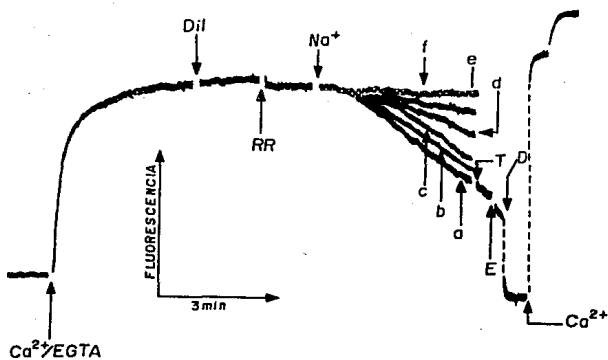


Figura 20. Inhibición por Diltiazem (Dil), del flujo de Ca^{2+} inducido por Na^+ en presencia de $0.5\mu\text{M}$ de Rojo de rutenio (RR), utilizando una concentración externa de Ca^{2+} de $0.131\mu\text{M}$ en mitocondrias de corazón. (a) No Dil. (b) $0.131\mu\text{M}$. (c) $0.046\mu\text{M}$. (d) $0.062\mu\text{M}$. (e) $0.125\mu\text{M}$. (f) $0.25\mu\text{M}$. (g) $0.5\mu\text{M}$. Mitocondrias incubadas en KME, por 5 min y 100% de O_2 . (T: Tris, E: EGTA, D: Desoxicolato). (Figura representativa de 3 preparaciones mitocondriales diferentes)

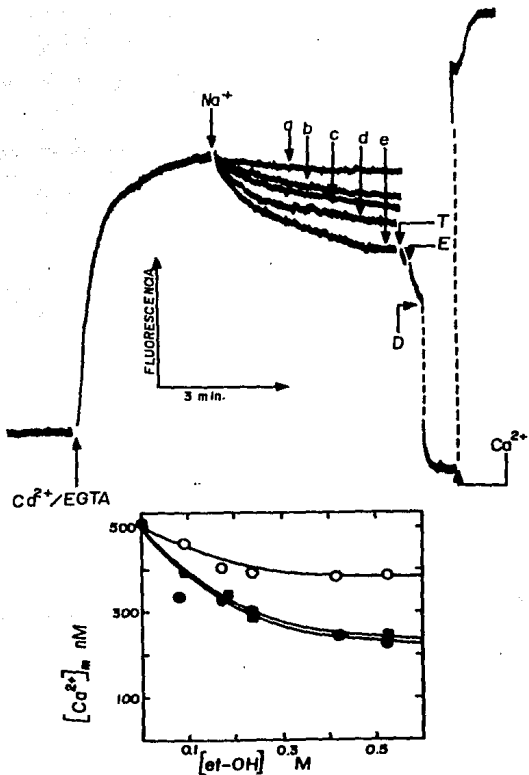


Figura 21. Activación por etanol (et-OH) de la salida de Ca^{2+} inducida por Na^+ (a), Li^+ (b), y Rojo de rutenio (c). (a) No et-OH. (b) 0.085M. (c) 0.170M. (d) 0.256M. (e) 0.427M. (f) 0.512M. Mitochondrias de corazón incubadas en KME, a 25°C, durante 5min y 100% de O_2 . (T: Tris, E: EGTA, D: Desoxicolato). (Figura representativa de 2 preparaciones mitocondriales diferentes)

Capítulo V.

1.5. Discusión

1.5.1. Control de la fosforilación oxidativa:

Como se puede observar en las Tablas III, IV y V, las únicas enzimas que contribuyen a el control de flujo de la fosforilación oxidativa en los tres casos fueron: El acarreador de AdN, la ATP-sintetasa y la citocromo-oxidasa, pero en realidad comparando los valores de C_i encontrados para cada sistema, solamente se tiene la contribución real de dos enzimas: El acarreador de AdN con un C_i de 0.69, y la ATP-sintetasa con un C_i de 0.3-0.2. Es de llamar la atención que solamente se tengan dos enzimas como reguladoras de flujo en una ruta metabólica compleja, ya que la teoría de control establece que el control es múltiple y los datos obtenidos en mitocondrias de riñón, corazón e hígado [98], así lo demuestran (Tabla VII). En nuestro caso no sólo se distribuye en dos de ellas, sino que fue consistente en los tres sistemas empleados, ya que cada uno tiene valores de C_i prácticamente iguales. Además la suma de los grados de control es siempre igual o cercana a uno, lo cual hace pensar que no exista una contribución significativa de las deshidrogenasas del ciclo-TCA al

Tabla.VII.Coefficientes de control de flujo (C_i) obtenidos y reportados para cada una de las etapas que integran la fosforilación oxidativa en diferentes tejidos de mamífero.

| Fuente. | Hepatoma. Estado 3. | Hígado. [138] Estado 3. | Corazón. [98] Estado 3. |
|--------------------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Acarreador de ATP/ADP | .69±.02 | .29-.6 | .32 |
| ATP-sinte-tasa. | .32±.06 | .04-.5 | .22 |
| Acarreador de P_i . | 0±0 | 0-.08 | .25 |
| Sitio I. | 0±0 | ---- | .03 |
| Sitio II. | 0±0 | .03-.37 | .04 |
| Citocromo-oxidasa. | .02±.001 | .1-.17 | .02 |
| Acarreador de pir. | 0±0 | .08-.33 | --- |
| Permeabili dad a H^+ . | .97±.2 | .9 | 1.0 |

flujo de la fosforilación oxidativa, en estas condiciones.

Existen diversos informes en la literatura donde se describen grandes anomalías a nivel de las rutas oxidativas de mitocondrias tumorales [110-113], específicamente a nivel del ciclo-TCA (ver figuras 5 y 6), el cual se describe como "truncado"; este truncamiento involucra a dos de las enzimas que se han utilizado para este estudio las cuales son: El complejo de la piruvato-DH, y de la α -ceto-glutarato-DH. A nivel de la primera se describe una gran tendencia de metabolizar al piruvato adicionado hacia un producto de degradación que sólo se encuentra en levaduras, bacterias o en situaciones patológicas como el alcoholismo, este producto es la acetoína.

La conversión total de piruvato a acetoína en nuestro estudio se pone en duda, debido a que si realmente existiera una fuga a ese nivel, la cantidad de sustrato que ingresara al ciclo-TCA en forma de acetilCoA sería mínima, por lo que se limitaría en gran medida el flujo de rutas relacionadas con ésta, principalmente a nivel de cadena respiratoria y con ello, la actividad y valor de los C_1 para este sistema en comparación con los otros dos sistemas empleados.

Otro resultado obtenido en este estudio y que hace dudar de la completa metabolización del piruvato a

acetoina es la relación ADP/O obtenida; para este sistema en particular es muy cercana a tres, lo cual concuerda para la ruta clásica de oxidación de acetilCoA.

Los resultados obtenidos para el sistema de la α -CGDH usando glutamato y malato como sustratos, indican que tampoco existe una contribución significativa al flujo de la fosforilación oxidativa por parte de esta enzima, ya que tanto las enzimas como los valores de C_i encontrados son iguales a los del sistema anterior; al igual que los valores de ADP/O obtenidos para este caso (Tabla II.), esto concuerda con lo descrito para la oxidación de glutamato ya que como se mencionó anteriormente la oxidación de este sustrato es igual que la descrita en mitocondrias hepáticas.

En la literatura se describe que a nivel de esta enzima [110-115] se tiene quizá el mayor flujo de las enzimas que integran el ciclo-TCA, ya que el principal sustrato y fuente de energía (vía rutas oxidativas) es la glutamina, la cual se convierte en α -cetoglutarato mediante una reacción de transaminación para ingresar al ciclo-TCA y ser oxidado. En todo este proceso no se describen reacciones de síntesis de ATP.

Comparando los resultados obtenidos de los otros dos sistemas con los obtenidos para este caso es concluyente que no existe una contribución significativa de la succinato-deshidrogenasa al flujo de la fosforilación oxidativa; esta idea es reforzada por el hecho de que todas las sumatorias de los C_i en los tres sistemas arroja un valor prácticamente de uno, indicando que no existen otros sitios que contribuyan de forma importante al control de la ruta evaluada.

El flujo inicial para cada uno de los sistemas es mucho menor que el encontrado para mitocondrias de otros tejidos de mamífero [98], esto tal vez esté relacionado con la misma estructura mitocondrial, ya que se informa que la membrana de estas mitocondrias es rica en colesterol.

El mayor contenido de colesterol le debe dar una fluidéz extra a la membrana de estas mitocondrias lo cual tal vez disminuya los diferentes gradientes electroquímicos necesarios para el buen funcionamiento de la ruta de fosforilación oxidativa, pero los valores de $\Delta\phi$ obtenidos indican que aparentemente el potencial electroquímico no es afectado por el elevado contenido de colesterol mitocondrial, ya que estos son muy semejantes a los informados para otros sistemas

[98], pero posiblemente el mayor contenido de colesterol en estas mitocondrias incrementa la unión inespecífica de TPP, lo cual produciría valores de potencial sobreestimados.

El contenido de colesterol en las mitocondrias tampoco afectó la permeabilidad a protones en el estado 4 de la respiración mitocondrial ya que los valores obtenidos para esta en los tres sistemas es muy cercano a la unidad (Tabla VII) indicando que al igual que en corazón e hígado es el único sitio de control en condiciones no fosforilantes.

Se había descrito que estas mitocondrias tenían disminuida la cantidad de citocromos con respecto a las encontradas en mitocondrias de hígado. En nuestras condiciones no existe una disminución aparente de ninguna de las enzimas que integran el proceso de fosforilación oxidativa (excepto citocromo-oxidasa y acarreador de piruvato, que no se midieron) lo cual no puede explicar el que la ATP-sintetasa y sobre todo el acarreador de AdN sean tan limitantes en este sistema. Una explicación tentadora para el caso de la ATP-sintetasa es la existencia de una proteína inhibidora natural que se une a la enzima bajo ciertas condiciones; en nuestro caso tal vez el que la ATP-sintetasa aparezca como limitante se deba a su parcial inhibición por esta proteína [90,94,98].

En el caso del acarreador de AdN una explicación probable para el elevado control que ejerce sobre esta ruta se correlacione directamente con la relación ATP/ADP, ya que esta guarda un vínculo directo con la actividad del translocador de AdN, debido a que si existe una relación ATP/ADP extramitocondrial elevada se puede incrementar la energía libre del translocador de AdN por lo tanto se incrementaría su actividad [80], en nuestro caso probablemente exista una relación ATP/ADP muy baja en la matriz mitocondrial y por ello su actividad disminuya dando como consecuencia el que sea muy limitante en el flujo de la fosforilación oxidativa.

1.5.2. Transporte de Ca^{2+} mitocondrial:

Al igual que en la parte correspondiente a los resultados la discusión de esta sección se dividirá en tres partes.

1.5.2.1. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$:

Para el caso de este intercambiador y su contribución en la determinación de la concentración interna de Ca^{2+} libre mitocondrial se realizaron los experimentos mostrados en las figuras 13-17, encontrando en la figura 14 (círculos oscuros), que el eflujo de Ca^{2+} inducido por Na^+ es dependiente de la concentración de Ca^{2+} extramitocondrial, y este eflujo puede sufrir una inhibición muy pronunciada en rangos

de concentraciones de Ca^{2+} considerados como fisiológicos, en nuestro caso cuando se manejan concentraciones de Ca^{2+} mayores de 400-600nM.

El experimento anterior se corroboró utilizando un catión químicamente muy semejante al Na^+ , éste fue el caso del Li^+ , que se muestra en la figura 15. Es evidente que al igual que con Na^+ el eflujo de Ca^{2+} inducido por Li^+ es dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_0$ y que se pueden alcanzar inhibiciones en el mismo rango de concentraciones de Ca^{2+} (>400-600nM) consideradas dentro del fisiológico, en el caso del Li^+ la cinética es menos pronunciada que con Na^+ , esto concuerda con los datos reportados en la literatura de que la eficiencia de este catión para inducir el eflujo de Ca^{2+} es menor que la del Na^+ .

Para evaluar el efecto del potasio sobre el influjo y eflujo de Ca^{2+} , se realizaron los experimentos que aparecen en las figuras 13 y 14 (en círculos oscuros), encontrando cinéticas prácticamente iguales en los dos sistemas. La diferencia real es evidente en la parte superior de las figuras, en donde se observa que tanto la velocidad de eflujo como la de influjo en presencia de K^+ son mayores, indicando que el papel de este ión en el transporte de Ca^{2+} es la de incrementar la velocidad de captación y salida, como se había descrito en reportes anteriores [7].

El sistema se puede volver aun más limitante si se adiciona al medio RR para inhibir la ruta de influjo [7], y poder estudiar exclusivamente la contribución de las rutas de salida de Ca^{2+} ; esto se muestra en las figuras 16 y 17 (en círculos oscuros). En la figura 16 se muestra que el el eflujo de Ca^{2+} inducido por Na^+/RR en ausencia de K^+ es dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ y que se pueden tener pequeñas inhibiciones del eflujo con concentraciones de Ca^{2+} consideradas dentro del rango fisiológico, pero a diferencia de las anteriores la inhibición máxima se alcanza solamente utilizando concentraciones de Ca^{2+} que estan fuera del rango fisiológico.

En presencia de K^+ e induciendo el eflujo de Ca^{2+} con Na^+/RR no se tiene una dependencia del eflujo sobre las concentraciones de Ca^{2+} consideradas dentro del rango fisiológico, ya que la inhibición máxima se alcanza con concentraciones de Ca^{2+} superiores a $1.5\mu\text{M}$, y en este caso la curva obtenida denota un efecto del "todo o nada".

Los experimentos anteriores corresponden a ensayos realizados en condiciones cercanas a las fisiológicas.

Por ello, para tener una clara idea de lo que ocurre en condiciones fisiológicas se incluyeron en el estudio del eflujo inducido por Na^+ dos ensayos

realizados en presencia de P_i , Mg^{2+} y espermina, los cuales se encuentran normalmente en la célula y juegan un papel crucial en el transporte de Ca^{2+} [7,10,12,37], las cinéticas obtenidas se muestran en las figuras 14 y 16 (en círculos claros), en donde se observa que el eflujo en ausencia de RR es dependiente de la $[Ca^{2+}]_o$ y que se alcanzan los mismos niveles de inhibición en rangos de concentraciones de Ca^{2+} consideradas como fisiológicas (>400-600nM), en el caso de la cinética obtenida en presencia de RR, ésta es muy semejante a la obtenida para Na^+ en ausencia de K^+ (figura 15), ya que se observan muy pequeñas inhibiciones del eflujo de Ca^{2+} inducido por Na^+/RR en rangos considerados como fisiológicos, aunque la inhibición total se alcanza con concentraciones de Ca^{2+} externo mayores de $1.5\mu M$. Es importante notar que en este caso no se tiene un efecto aparente del "todo o nada" como el encontrado para el caso equivalente en ausencia de P_i , Mg^{2+} y espermina (figura 17, círculos oscuros).

1.4.2.2. Intercambiador H^+/Ca^{2+} :

Para evaluar la contribución de este intercambiador se trabajó en todos los experimentos con diltiazem, la titulación de la inhibición del eflujo de Ca^{2+} inducido por Li^+ se muestra en la figura 18. De esta curva se tiene un valor de $K_{0.5}$ aproximada de

350 μ M, que es superior a la reportada en la literatura por Vághy y cols. [45], lo cual indica que probablemente en nuestras condiciones el diltiazem tenga que inhibir tanto al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ como $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$. Esto se puede corroborar con los datos obtenidos para la inhibición del eflujo inducido por Na^+ (figura 19), en donde se tiene un valor de $K_{0.5}$ aproximado de 350mM, que es 1000 veces mayor que para el caso del Li^+ ; esto se debe sin duda alguna a la menor eficiencia del Li^+ para inducir el eflujo.

En el caso de la inhibición del eflujo de Ca^{2+} inducido por Na^+/RR se tiene que el valor de $K_{0.5}$ aproximado para diltiazem es de 700 μ M, el cual es 500 veces menor al obtenido para Na^+ y el doble de el obtenido para el caso del Li^+ .

En este caso las diferencias entre los valores de $K_{0.5}$ obtenidas para el caso del eflujo inducido por Na^+ y Na^+/RR no se esperaban, ya que el catión utilizado para inducir el eflujo fue el mismo, solamente que en un caso son evaluadas exclusivamente las rutas de eflujo, inhibiendo al influjo con RR.

Una explicación para ello sería que en el caso de el experimento realizado en presencia de RR el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sea el que contribuye casi totalmente a el eflujo de Ca^{2+} necesitando menores concentraciones de diltiazem para inhibir totalmente el

eflujo y, en el caso de el experimento realizado en ausencia de RR, se tenga una contribución más importante del intercambiador H^+/Ca^{2+} , necesitando cantidades muy elevadas de diltiazem para inhibir totalmente el eflujo.

En cualquier caso, pese a las cantidades tan elevadas de diltiazem, no se tuvieron alteraciones en la preparación mitocondrial a diferencia de lo reportado por otros autores [45].

Otros mecanismos de eflujo de Ca^{2+} :

Recientemente Rottenberg y Marbach [51] reportaron una activación del intercambiador Na^+/Ca^{2+} por et-OH, este estudio se realizó en condiciones no fisiológicas y era saturable a una concentración de et-OH de 0.2M.

En nuestras condiciones este estudio nos proporcionó una excelente manera de estudiar a los mecanismos de eflujo de Ca^{2+} no caracterizados completamente, debido a que se describían efectos de la fosfolipasa A_2 en el mecanismo de eflujo y un poro sensible a ciclosporina [61-69]. Las cinéticas encontradas en nuestro caso para el intercambiador Na^+/Ca^{2+} se muestran en la figura 21; el eflujo de Ca^{2+} se indujo nuevamente con Na^+ (círculos oscuros) y, para corroborar los resultados, se utilizó Li^+ (en cuadros oscuros). Se puede apreciar que también se tiene una estimulación franca del eflujo, la cual es

prácticamente igual en el caso del Li^+ . Esto no era lo que se esperaba, debido a que el Li^+ es menos eficiente para inducir el eflujo y en nuestras condiciones este reporte ya se había corroborado, la explicación a esto es que la estimulación del influjo de Ca^{2+} vía el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ involucre un mecanismo común para el proceso de eflujo mediado por estos iones.

En el caso del intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ también existe una franca estimulación del mismo por et-OH y es mostrado en la figura 21 (en círculos claros), la activación es menor que en el caso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y en los tres casos la señal se satura con concentraciones de et-OH de 0.5M.

La concentración de et-OH a la cual se satura el eflujo de Ca^{2+} no concuerda con las reportadas por Rottenberg y Marbach lo cual podría esperarse, ya que en este estudio se manejaron mitocondrias de corazón y en el realizado por los autores mencionados se utilizó como modelo mitocondrias de cerebro de rata.

Por último, es importante hacer notar que las concentraciones de et-OH a las cuales ocurre la activación del eflujo de Ca^{2+} por este alcohol son muy cercanas a las reportadas en suero y sangre.

Conclusiones

Control de la fosforilación oxidativa:

1. En todos los sistemas estudiados se registraron principalmente dos enzimas reguladoras de flujo: El acarreador de adenín nucleótidos y la ATP-sintetasa.

2. Debido a lo anterior no parece existir una contribución importante de las deshidrogenasas del Ciclo de Krebs al flujo en este sistema.

3. En el estado 4 el principal punto de control es la permeabilidad pasiva a los protones, teniendo valores semejantes a los reportados para otros sistemas mitocondriales.

4. Al igual que otros estudios es posible que exista un fuerte acoplamiento funcional entre el acarreador de adenín-nucleótidos y la ATP-sintetasa, ya que parece existir una relación recíproca entre la actividad de ambos y el que este modelo los presente como únicos sitios de control lo hace ideal para el estudio de esta hipótesis.

Transporte de Ca^{2+} mitocondrial:

1. Los datos obtenidos confirman que el gradiente mitocondrial está invertido, o sea $[\text{Ca}^{2+}]_o > [\text{Ca}^{2+}]_m$

cuando la concentración de Ca^{2+} libre es menor a 500nM. En estas condiciones la velocidad de intercambio $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es mayor que la entrada electrogénica de Ca^{2+} .

2. Los datos muestran que existe una modulación de la salida de Ca^{2+} a nivel del intercambiador $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ debido a una inhibición del mismo por concentraciones de Ca^{2+} externo.

3. La activación de la salida de Ca^{2+} por et-OH también ocurre en condiciones cercanas a las fisiológicas, aunque se satura con concentraciones de et-OH > de 0.4M, y debido a que esta activación ocurre en igual magnitud y de forma independiente del catión utilizado para inducir el eflujo probablemente involucre un cambio de permeabilidad en la membrana mitocondrial ocasionado por la activación de la fosfolipasa A_2 mitocondrial.

4. El hecho de que en condiciones muy cercanas a las fisiológicas las mitocondrias puedan almacenar cantidades de Ca^{2+} comprendidas dentro del rango fisiológico apoya la idea de que este organelo podría jugar un papel importante en la regulación de los gradientes de Ca^{2+} celular.

Bibliografía

- [1]. Stryer, L. (1988): Biochemistry (W.H. Freeman and Co. ed.), pp.282,393-409, New York.
- [2]. David, G. (1964): La célula viva (Scientific American ed.), pp.105-113, EUA.
- [3]. Wainio. (1980): The Mammalian Mitochondrial Respiratory Chain (Omega ed.), pp. 1-73, EUA.
- [4]. Lehninger, A. (1978): Bioquímica (Omega ed.), pp.519-543, México.
- [5]. Rawn, J. (1989): Biochemistry (Neil Patterson ed.) pp.365-377, EUA.
- [6]. Nicholls, G. (1982): Bioenergetics (An introduction to the Chemiosmotic Theory) (Academic Press ed.) pp.24-120,151-164,419-425, London N.Y.
- [7]. Nicholls, D., and Akerman, K. (1982) Biochim. Biophys. Acta. 683: 57-88.
- [8]. Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Becker, G., and Lehninger, A. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun. 47: 814-819.
- [9]. Rottenberg, H., and Scarpa, A. (1974) Biochem. 13: 4811-4817.
- [10]. Carafoli, E. (1976) en: Mitochondria Bioenergetics Biogenesis and Membrane Structure (Academic Press ed.) pp.47-60, N.Y. Sn. Fco. London.
- [11]. Carafoli, E., and Crompton, M. (1978) Ann. NY Acad. Sci. 307: 269-284.

- [12].Carafoli, E. (1979) FEBS Lett. 104: 1-5.
- [13].Denton, M.R., and McCormack, G. (1980) FEBS Lett. 119: 1-8.
- [14].Kathleen, E.C., Sunesh, K.J., Corkey, B., and Williamson, R.J. (1982) J. Biol. Chem. 257: 8696-8704.
- [15].Barritt, J.G. (1981) J. Membrane Biol. 62: 53-63.
- [16].Hansford, G.R., and Castro, F. (1982) J. Bioen. Biomembranes. 14: 361-375.
- [17].Kondrashova, M.N., Gogvadze, V.G., Medvedev, B.I., and Babsky, A.M. (1982) Biochem. and Biophys. Res. Commun. 109: 376-381.
- [18].Bernardi, P. (1984) Biochim. Biophys. Acta. 766: 277-282.
- [19].Crompton, M. (1985) Current Topics in Membranes and Transport. 25: 231-276.
- [20].Kröner, H. (1986) Archives of Biochem. and Biophysics. 251: 525-535.
- [21].Wingrove, E.D., and Gunter E.T. (1986) J. Biol. Chem. 261: 15166-15171.
- [22].Goldstone, P.T., Roos, I., and Crompton, M. (1987) Biochem. 26: 246-254.
- [23].Rizzuto, R., Bernardi, P., Favaro, M., and Azzone, F. (1987) Biochem. J. 246: 271-277.
- [24].Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Crovetti, F., and Kratzing, C. (1974) J. Mol. Cell. Cardiol. 6: 361-371.

- [25].Crompton, M., Capano, M., and Carafoli, E. (1976) Eur. J. Biochem. **69**: 453-462.
- [26].Affoler, H., and Carafoli, E. (1980) Biochem. and Biophys. Res. Commun. **95**: 193-196.
- [27].Crompton, M., Heid, I., and Carafoli, E. (1980) FEBS Lett. **115**: 257-259.
- [28].Lamya, H.H., and Crompton, M. (1982) Biochem. J. **202**: 509-518.
- [29].Korsten, A.M., Gordon, R.E., Klingenstein, J., and Lieber, S. (1983) Biochem. and Biophys. Res. Commun. **117**: 169-175.
- [30].Kimberly, M., Broekemeier, M., Schmid, C.P., Schmid, O.H., and Pfeiffer, R.D. (1985) The J. of Biol. Chem. **260**: 105-113.
- [31].Nedergard, J. (1984) Eur. J. Biochem. **144**: 159-168.
- [32].Rustenbeck, I., and Lenzen, S. (1989) Biochim. Biophys. Acta. **982**: 147-155.
- [33].Lenzen, S., Görlich, J-K., and Rustenbeck, I. (1989) Biochim. Biophys. Acta. **982**: 140-146.
- [34].Rottenberg, H., and Marbach, M. (1990) FEBS Lett. **274**: 65-68.
- [35].Jung, D.W., Baysal, K., and Brierley, G.P. (1991) Membrane Transport Biophysical J. **59**: 135a.
- [36].Rottenberg, H., and Marbach, M. (1991)

Life Sciences. 48: 987-994.

[37].Rottenberg, H., and Marbach, M. (1990) Biochim. Biophys. Acta. 1016: 87-98.

[38].Scarpa, A., and Graziotti, P. (1973) J. Gen. Physiol. 62: 756-772.

[39].Rossi, C., Vasington, D., and Carafoli, E. (1973) Biochem. and Biophys. Res. Commun. 50: 244-252.

[40].Vasington, D., Gazzotti, P., Tiozzo, R., and Carafoli, E. (1972) Biochim. Biophys. Acta. 256: 43-54.

[41].Sordahl, A.L. (1975) Arch. Biochem. and Biophys. 167: 104-115.

[42].Roth, Z., and Dikstein, B. (1982) Biochem. and Biophys. Res. Commun. 105: 991-996.

[43].Bernardi, P., and Paradisi, V., Pozzan, T., and Azzone, G.F. (1984) Biochem. 23: 1645-1651.

[44].Coelho, L.J., and Vercesi, E.A. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 204: 141-147.

[45].Vághy, L.P., Johnson, J.D., Mohammed, M.A., Wang, T., and Schwartz, A. (1982) J. Biol. Chem. 257: 6000-6002.

[46].Sordahl, A.L., LaBelle, E.F., and Rex, A.K. (1984) Am. J. Physiol. 246: c172-c176.

[47].Zoccarato, F., Rugolo, M., Siliprandi, D., and Siliprandi, N. (1981) J. Biochem. 114: 195-199.

- [48].Hayat, L.H., and Crompton, M. (1987) *Biochem. J.* **244**: 533-538.
- [49].McCormack, G.J. (1989) *Biochem. J.* **264**: 167-174.
- [50].Jensen, R.J., Lynch, G., and Baudry, M. (1989) *J. Neurochem.* **53**: 1182-1187.
- [51].Rottenberg, H., and Marbach, M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta.* **1016**: 77-86.
- [52].Roos, I., Crompton, M., and Carafoli, E. (1980) *Eur. J. Biochem.* **110**: 319-325.
- [53].Zoccarato, F., and Nicholls, D. (1982) *Eur. J. Biochem.* **127**: 333-338.
- [54].Gunter, E.T., Chace, H.J., Puskin, S.J., and Gunter, K.K. (1983) *Biochem.* **22**: 6341-6351.
- [55].Meli, J., and Bygrave, L.F. (1972) *Biochem. J.* **128**: 415-420.
- [56].Denton, M.R., Randle, P.J., and Martin, R.B. (1972) *Biochem. J.* **128**: 161-163.
- [57].Denton, M.R., Richards, A.D., and Chin, G.J. (1978) *Biochem. J.* **176**: 899-906.
- [58].Denton, M.R., McCormack, G.J., and Edgell, J.N. (1980) *Biochem. J.* **190**: 107-117.
- [59].Williamson, R.J., and Cooper, H.R. *FEBS Lett.* **117**: k73-k85.
- [60].Moreno-Sánchez, R. (1985) *The J. of Biol. Chem.* **260**: 4028-4034.
- [61].Hansford, G.R., Moreno-Sánchez, R., and

- Lewartowski, B. (1989) Ann. NY Acad. Sci. 573: 240-253.
- [62].Lawlis, V.B., and Roche, E.T. (1981) Biochem. 20: 2512-2518.
- [63].Hansford, G.R. (1981) Biochem. J. 194: 721-732.
- [64].Hansford, G.R., and Castro, F. (1981) Biochem. J. 198: 525-533.
- [65].Johnston, D., and Brand, D.M. (1987) Biochem. J. 245: 217-222.
- [66].Broekemeier, M.K., Dempsey, E.M., and Pfeiffer, R.D. (1989) J. Biol. Chem. 264: 7826-7830.
- [67].Crompton, M., Ellinger, H., and Costi, A. (1988) Biochem. J. 255: 357-360.
- [68].Crompton, M., Costi, A., and Hayat, L. (1987) Biochem. J. 245: 915-918.
- [69].Al-Nasser, I., and Crompton, M. (1986) Biochem. J. 239: 19-29.
- [70].Kacser, H., and Burns, A.J. (1973) Symp. Soc. Exp. Biol. 27: 64-104.
- [71].Moreno-Sánchez, R. (1985) en: Papel del Ca^{2+} en la Regulación de la Fosforilación-oxidativa Mitocondrial, pp.15-36, Tesis UNAM. México.
- [72].Moreno-Sánchez, R., Torres-Márquez, Ma. E., and Gómez-Puyou, A. (1992) Trends. Memb. Bioenerg. 119-150.
- [73].Parteous, W.J. (1983) TIBS. 8: 200-202.

- [74].Groen, K.A., and Wanders, J.A.R. (1984) Biosci. Reports. 4: 1-22.
- [75].Kacser, H. and Burns, A. (1979) J. Bioch. Soc. Trans. 7: 1149-1160.
- [76].Crabtree, B., and Newsholme, A.E. (1987) Biochem. J. 247: 113-120.
- [77].Kacser, H. and Porteous, W.J. (1987) TIBS. 12: 5,6,12-15.
- [78].Crabtree, B., and Newsholme, A.E. (1987) TIBS. 12: 4,6,8,10.
- [79].Sen, K.A. (1990) Biochem. J. 269: 141-147.
- [80].Wanders, J.A.R. (1985) en: Quantitative Studies on Control of Flux in Respiration, Ammoniogenesis and Ammonia Utilization in Rat-Liver Mitochondria, pp.1-64, Boek, Tesis Amsterdam.
- [81].Groen, K.A. (1984) en: Quantification of Control in Studies on Intermediary Metabolism, pp.9-65, Tesis Amsterdam.
- [82].Holian, A., Owen, S.C., and Wilson, F.D. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 181: 164-171.
- [83].Stubbs, M., Vignais, V.P., and Krebs, A.H. (1978) Biochem. J. 172: 333-342.
- [84].Forman, G.N., and Wilson, F.D. (1983) J. Biol. Chem. 258: 8649-8655.
- [85].Gellerich, N.F., Bohnensack, R., and Kunz, W. (1983) Biocim. Biophys. Acta. 722: 381-391.

- [86].Duszynski, J., Groen, K.A., Wanders, A.J.R., Vervoorn, C., and Tager, M.J. (1982) FEBS Lett. 146:
- [87].Baggetto, L., Gautheron, C.D., and Godinot, C. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 232: 670-678.
- [88].Westerhoff, V.H., Bode, A.J., and Dam, V.K. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 257: 154-169.
- [89].Bohnensack, R., Gellerich, N.F., Schild, L., and Kunz, W. (1990) Biochim. Biophys. Acta. 1018: 182-184.
- [90].Moreno-Sánchez, R., Hogue, A.B., and Hansford, G.R. (1990) Biochem. J. 268: 421-428.
- [91].Groen, A.K., Wanders, A.J.R., Westerhoff, V.H., Meer, V.R., and Tager, M.J. (1982) 257: 2754-2757.
- [92].Tager, M.J., Wanders, A.J.R., Groen, A.K., Kunz, W., Bohnensack, R., Küster, U., Letko, G., Böhme, G., Duszynsky, J., and Wojtczak, L. (1983) FEBS Lett. 151: 1-9.
- [93].Doussiere, J., Ligeti, E., Brandalin, G., and Vignais, V.P. (1984) Biochim. Biophys. Acta. 766: 492-500.
- [94].Moreno-Sánchez, R. (1985) The J. Biol. Chem. 260: 12554-12560.
- [95].Davis, J.E., Thienen, D.A.W. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 233: 573-581.
- [96].Mazart, J-P., Jean-Bart, E., Rigoulet, M., and

- Guerin, B. (1986) *Biochim. Biophys. Acta.* **849**: 7-15.
- [97].Moreno-Sánchez, R., Espinosa-García, M.T., and Raya, C. (1988) en: *Integration of Mitochondrial Function.* (John Lemasters ed.) pp.297-304.
- [98].Moreno-Sánchez, R., Devars, S., López-Gómez, F., Uribe, A., and Corona, N. (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* **1060**: 284-292.
- [99].Lazo, A.P. (1981) *Eur J. Biochem.* **117**: 19-25.
- [100].Mihai, C. (1983) *Rev. Roum. Biochim.* **20**: 185-193.
- [101].Fleschner, C.R., Martin, P.A., Vorbeck, L.M., Darnold, R.J., and Long, W.J. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**: 430-436.
- [102].Lau, W.B., and Chan, P.H.S. (1984) *Cancer Res.* **44**: 4458-4464.
- [103].McIntryne, J.H., and Bygrave, L.F. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **165**: 744-748.
- [104].Villalobo, A., and Lehninger, L.A. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 2457-2464.
- [105].Eboli, L.M., Malmström, K., Galeotti, T., Alarcón-López, L., and Carafoli, E. (1979) *Cancer Res.* **39**: 2737-2742.
- [106].Hayashi, J-I., Gotho, O., and Tagashira, Y. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* **205**: 27-35.
- [107].Abou-Khalil, S., Abu-Khalil, H.W., and Yunis, A.A. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **209**: 460-464.

- [108].Parlo, R.A., and Coleman, S.P. (1986) *Biochim. Biophys. Acta.* **886**: 169-176.
- [109].Müller, M., Siems, W., Buttgereit, F., Dumdey, R., and Rapoport, M.S. (1986) *Eur. J. Biochem.* **161**: 701-705.
- [110].Baggetto, L.G., and Lehninger, L.A. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **145**: 153-159.
- [111].Baggetto, L.G., and Lehninger, L.A. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 9535-9541.
- [112].Kelleher, K.J., Bryan, M.B., Mallet, T.R., Holleran, L.a., Murphy, N.A., and Fiskum, G. (1987) *Biochem. J.* **246**: 633-639.
- [113].Baggetto, G.L., and Resta-Parussini, R. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **283**: 241-248.
- [114].Murphy, N.A., Kelleher, K.J., and Fiskum, G. (1990) *The J. Biol. Chem.* **265**: 10527-10534.
- [115].Argilés, M.J., and López-Sarriano, F.J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 2978-2982.
- [116].Gunter, T.E., Chace, J.H., Puskin, J.S., and Gunter, K.K. (1983) *Biochem.* **22**: 6341-6351.
- [117].Moreadith, W.R., and Fiskum, G. (1984) *Analytical Biochem.* **137**: 360-367.
- [118].Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, Y.R. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**: 3440-3450.

- [119].Moreno-Sánchez, R., Torres-Márquez, Ma. E., and López-Gómez, F.J. (En prensa)
- [120].Rottenberg, H. (1984) *J. Membrane Biol.* **81**: 127-138.
- [121].McCormack, J.G., Halestrap, A.P., and Denton, R.A. (1990) *Physiol. Rev.* **70**: 391-425.
- [122].González-Halphen, D. (1990) *Ciencia.* **41**: 133-152.
- [123].Minta, A., and Tsien, Y.R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 19449-19457.
- [124].Harootunian, T.A., Kao, Y.P.J., Eckert, K.B., and Tsien, Y.R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 19458-19467.
- [125].Davis, H.M., Altschuld, A.R., Jung, W.D., and Brierley, P.G. (1987) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **149**: 40-45.
- [126].Moreno-Sánchez, R., and Hansford, G.R. (1988) *Biochem. J.* **256**: 403-412.
- [127].McCormack, G.J., Browne, M.H., and Dawes, J.N. (1989) *Biochim. Biophys. Acta.* **973**: 420-427.
- [128].Saavedra-Molina, A., Uribe, S., and Devlin, M.T. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **167**: 148-153.
- [129].Kao, Y.P.J., Harootunian, T.A., and Tsien, R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 8179-8184.
- [130].Al-Nasser, I., and Crompton, M. (1986) *Biochem. J.* **239**: 31-40.

- [131].John, R.G., Littleton, M.J., and Nhamburo, T.P. (1985) *J. Neurochem.* **44**: 1235-1241.
- [132].Crompton, M., and Costi, A. (1990) *Biochem. J.* **266**: 33-39.
- [133].Crompton, M. (1990) en: *Intracellular Calcium Regulation* (Felix Bronner ed.), pp.181-201, N.Y. London.
- [134].Gornall, A.G., and David, M.M. (1949) *J. Biol. Chem.* **177**: 751-766.
- [135].Birnie, D.G., and Fox, M.S. (1969) en: *Subcellular Components (Preparation and Fractionation)*, (Baltimore ed). pp.43-49, Butterworths.
- [136].Fabiato, A. (1988) *Methods in Enzymol.* **157**: 378-417.
- [137].Fabiato, A., and Fabiato, F. (1979) *J. Physiol.* **75**: 463-505.
- [138].Moreno-Sánchez, R., and Torres-Márquez, Ma. E. (1991) *Int. J. Biochem.* **23**: 1163-1174.

Apéndice A

(Aislamiento de mitocondrias de hepatoma AS-30D)

Diagrama de flujo para el aislamiento de mitocondrias de hepatoma por el método modificado:

Células tumorales de líquido de ascitis.

- a) Centrifugar 500g 2min.
- b) Resuspender el paquete en medio NKT (apéndice H).
- c) Centrifugar y resuspender dos veces más.*

Pastilla (C₁)

Sobrenadante

- a) Resuspender en medio SHE (apéndice H).*
- b) Centrifugar 625g 10min.

Pastilla (C₂)

Sobrenadante

- a) Resuspender hasta una concentración de $3-6 \times 10^6$ células/ml.*
- b) Titular con digitonina (marca Aldrich) en DMSO a 4°C y en agitación hasta lizar el 85-90% de las células.*
- c) Duplicar el volumen.
- d) Centrifugar 3015g 10min.*

*Modificaciones realizadas a la técnica original.

Pastilla (C₃)

Sobrenadante

- a) Resuspender y duplicar el volumen.
- b) Homogenizar.
- c) Llevar hasta 50ml.
- d) Centrifugar 625g 10min.

Pastilla (H₁)

Sobrenadante (S₁)

- a) Resuspender y duplicar el volumen.
- b) Homogenizar.
- c) Llevar hasta 50ml.
- d) Centrifugar 625g 10min.

Pastilla (H₂)

Sobrenadante (S₂)

- a) Resuspender y duplicar el volumen.
- b) Homogenizar.
- c) Llevar hasta 50ml.
- d) Centrifugar 625g 10min.

Pastilla (H₃)

Sobrenadante (S₁+S₂+S₃)*

- a) Centrifugar 9800g 10 min.

Pastilla (M_1)

Sobrenadante

a) Resuspender en el medio remanente con dedo frío e incubar con albúmina deslipidada al 5% (p/v) y 1mM de ADP 5min a 4°C.*

b) Duplicar el volumen con medio SHEA (apéndice H).

c) Centrifugar 9800g 10min.

Pastilla (M_2)

Sobrenadante

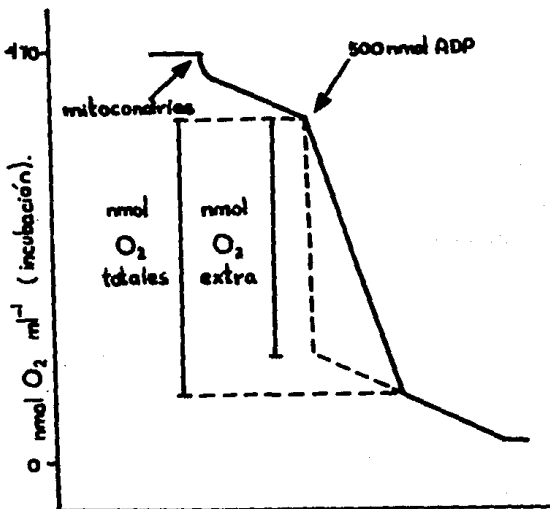
a) Resuspender con dedo frío en el medio remanente.

Apéndice B

(Medición del control respiratorio (CR), y relación ADP/O)

El CR se midió con la ayuda de un oxímetro y un electrodo de oxígeno tipo Clark, el cual solamente determina directamente la velocidad de una reacción.

A partir de estos controles respiratorios se puede establecer una relación muy importante a nivel mitocondrial la cual ha sido denominada como relación ADP/O ejemplo:



En este ejemplo las mitocondrias de hepatoma fueron incubadas con succinato como sustrato y rotenona. En donde se señala se adicionó ADP.

El CR es un parámetro pre-quimiosmótico para evaluar la calidad de la preparación mitocondrial, y es definido como la velocidad respiratoria mantenida durante la máxima síntesis de ATP, o en presencia de un translocador de protones por lo que se tienen las siguientes relaciones:

$$CR = \frac{\text{Respiración después de CCCP}}{\text{Respiración antes de CCCP}}$$

O bien:

$$CR = \frac{\text{Respiración en edo.3}}{\text{Respiración en edo.4}}$$

Los valores típicos para esta relación varían de 3 hasta 15 en diferentes preparaciones [6].

La relación ADP/O puede ser establecida mediante la técnica del electrodo de oxígeno, en este método el grado de actividad en el estado 3 de la respiración es obtenido con la adición de pequeñas alícuotas de ADP a las mitocondrias respirantes en estado 4, todas las adiciones de ADP son fosforiladas a ATP. La relación ATP:ADP viene siendo típicamente de 100:1 (figura) cuando se regenera un nuevo estado 4 y la relación de moles de ADP adicionado/moles de oxígeno consumidas

puede ser calculada, y por lo tanto, el número de ATPs sintetizados por ADP adicionado.

La solubilidad del oxígeno en agua a 30°C y a la altitud de la Cd. de México es aproximadamente 400ngatsO₂/ml, y al emplearse un volumen de 1.9ml a una temperatura de 30°C se tiene un valor de 780ngátomos de O₂/ml. De acuerdo a este valor y la distancia recorrida por cada estado 3, se pueden obtener la cantidad de ATPs sintetizados por cada ngato₂ consumido mediante la siguiente relación:

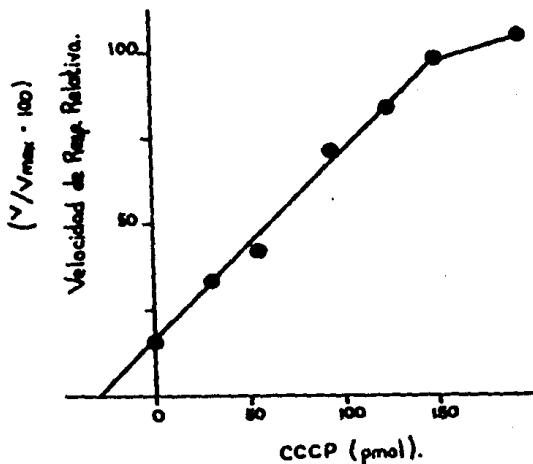
$$\text{ATP} = \text{nmolADP/ngato}_2 \text{ consumidos en edo.3.}$$

Apéndice C

(Permeabilidad pasiva a protones en estado 4)

La permeabilidad pasiva a protones se midió mediante el método propuesto por Groen [81]. Este se basa en titular el flujo en estado 4 con un ionóforo de protones, con la finalidad de tener diferentes grados de estimulación de la respiración, que se logran adicionando diferentes cantidades de ionóforo o desacoplante. El valor de la permeabilidad se traduce en función de la cantidad de desacoplante empleada.

La técnica fundamentalmente consiste en incubar a las mitocondrias con oligomicina para tener la seguridad de que no está ocurriendo ningún fenómeno de fosforilación, y entonces titular con diferentes cantidades de desacoplante. ejemplo:



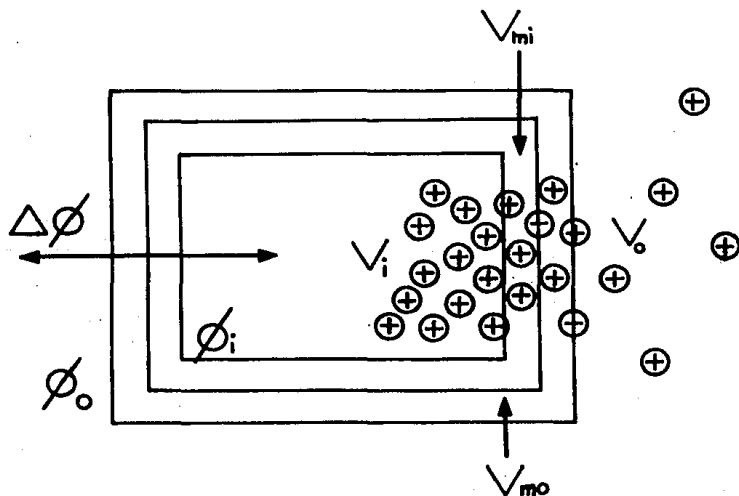
Como se muestra en la figura, bajo estas condiciones la velocidad de captación de oxígeno es una función lineal de la concentración de desacoplante (CCCP) adicionado.

Con la extrapolación a cero de la respiración (intersección con la abcisa) se obtiene cierta cantidad de desacoplante, la cual es equivalente a la actividad de la permeabilidad a protones. El valor de C_i para la permeabilidad pasiva a protones de la membrana mitocondrial podría ser entonces determinado por titulación con desacoplante a diferentes velocidades de respiración.

Apéndice D

(Medición del potencial transmembranal $\Delta\phi$)

La técnica empleada para la estimación cuantitativa del potencial transmembranal fue la descrita por Rottenberg [120]. Esta se basa en la captación y unión de cationes lipofílicos a la membrana mitocondrial como: etidio⁺, tetrafenilfosfonio⁺ (TPP⁺), trifenilmetilfosfonio⁺ (TPMP⁺), y tetrafenilarsonio⁺ (TPA⁺), considerando el siguiente modelo:



En donde V_o = volumen de disolvente extravascular, V_i = el volumen de disolvente interno, V_{mo} = el volumen de la superficie membranal externa, y V_{mi} = el volumen de la superficie membranal interna. Considerando que el volumen membranal es aquel ocupado por los fosfolípidos sobre la matriz y superficie citosólica de la membrana interna y que es aproximadamente la mitad del volumen de los fosfolípidos totales de la membrana interna. En este modelo solamente se considera la unión del catión a la membrana interna mitocondrial, ya que aunque la externa también puede contribuir no existe un potencial considerable a través de la misma y la unión a ésta se considera como parte de la superficie externa de la membrana interna (V_{mo}).

Con todas las consideraciones anteriores la ecuación propuesta para el cálculo del $\Delta\phi$ en nuestras condiciones es la siguiente:

$$\Delta\phi = (RT/ZF) \ln[(R_c V_o - K'_o) / (V_i + K'_i)]$$

Asumiendo que $K_{mo} = K_{mi}$ y $V_{mo} = V_{mi}$, entonces $K'_i = K'_o$, K'_i y K'_o se obtienen de la unión del anión lipofílico a la membrana interna mitocondrial, $RT/ZF = -60$, V_o = volumen del sobrenadante empleado, V_i = μg de proteína mitocondrial en μl asumiendo que $1\mu l = 1mg$, $R_c = CPM$ en la pastilla/ CPM en el sobrenadante.

En nuestro caso se empleó tetrafenilfosfonio tritiado ($^3\text{H-TPP}^+$), como catión lipofílico, la técnica consiste en incubar $100\mu\text{l}$ de la preparación mitocondrial en 1ml de medio KME adicionado con 3mM de fosfato, y los respectivos sustratos, a 30°C en agitación durante 2min , cumplido este tiempo se adicionaba un exceso de ADP, se toman diversas alícuotas de la preparación al minuto de haber adicionado el ADP, las alícuotas tomadas corresponden a la preparación completa, a el sobrenadante (después de centrifugar a 9000g 1min), y a la pastilla mitocondrial, para después contarlas utilizando un contador de centelleo marca Beckman modelo LS7800 y calcular el valor del $\Delta\phi$ de acuerdo a las ecuaciones propuestas.

Apéndice E**(Aislamiento de mitocondrias de corazón)**

Diagrama de flujo para aislar mitocondrias de corazón de rata mediante el método propuesto por Moreno-Sánchez [126]:

Corazón

- a) Picarlo y lavarlo con medio SHE. (apéndice H).
- b) Transferir al homogenizador y agregar por cada 600g de rata 3.5mg de NAGARSE.
- c) Homogenizar en un tiempo no mayor de 10min.
- d) Centrifugar a 9000g durante 10min.

Pastilla (M₁)**Sobrenadante (S₁)**

- a) Resuspender y homogenizar hasta la degradación total del tejido.
- b) Centrifugar a 625g durante 10min a 4°C.

Pastilla (M₂)**Sobrenadante (S₂)**

- a) Centrifugar a 9000g 10min a 4°C.

Pastilla (R₁)

Sobrenadante (S₃)

- a) Resuspender e incubar 5min, con albúmina deslipidada al 5% (p/v) y 1mM de ADP.
- b) Diluir con SHEA (apéndice H) hasta un volumen final de 45ml.
- c) Centrifugar a 9000g durante 10min.

Pastilla (R₂)

Sobrenadante (S₃)

- a) Resuspender con dedo frío.

Apéndice F

(Control de las concentraciones de Ca^{2+} externo)

La $[\text{Ca}^{2+}]_0$ se controló mediante el empleo de amortiguadores de $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$, realizados de acuerdo a lo propuesto por Fabiato [1136,137] como se indica en la siguiente tabla:

| $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$ estándar | $[\text{EGTA}]_t$ 500mM | $[\text{CaCl}_2]_t$ 1M | $[\text{MOPS}]_t$ 1M | H_2O | $\text{pH}_{\text{inicial}}$ |
|--|----------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|------------------------------|
| 0.15 | 5ml | 0.375ml | 1ml | 3.525ml | 7.3 |
| 0.30 | 5ml | 0.750ml | 1ml | 3.150ml | 6.468 |
| 0.50 | 5ml | 1.250ml | 1ml | 2.650ml | 4.678 |
| 0.65 | 5ml | 1.625ml | 1ml | 2.275ml | 4.529 |
| 0.80 | 5ml | 2.000ml | 1ml | 1.900ml | 4.387 |
| 1.00 | 5ml | 2.500ml | 1ml | 1.400ml | 4.280 |
| 1.20 | 5ml | 3.000ml | 1ml | 0.900ml | 4.200 |

En todos los casos el pH final de la solución se ajustó a 7.200 con Tris.

El cálculo de la $[\text{Ca}^{2+}]_0$ se realiza mediante programas de computadora establecidos por Fabiato, ya que permite calcular K_{As} relativas a partir de K_{As} absolutas. Partiendo de las concentraciones libres de ligando y de cationes se pueden calcular las

concentraciones totales requeridas de ligandos y cationes para generar determinados valores de los cationes libres [119].

Apéndice G

(Composición de los medios empleados)

Componentes: Concentración final.

a. SHE:

Sacarosa.....250mM.
 HEPES.....5mM.
 EGTA.....1mM.
 pH (ajustado con Tris).....7.2.

b. SHEA:

Sacarosa.....250mM.
 HEPES.....5mM.
 EGTA.....1mM.
 Albúmina bovina.....0.5% (p/v).
 pH (ajustado con Tris).....7.2.

c. NKT:

Cloruro de sodio.....150mM.
 Cloruro de potasio.....5mM.
 Tris/HCl.....10mM.
 pH.....7.5.

d. KME:

Cloruro de potasio.....120mM.
 MOPS.....20mM.
 EGTA.....1mM.
 pH (ajustado con Tris).....7.2.