



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INFLUENCIA DEL POTASIO SOBRE LA TRANSICION DE LA PERMEABILIDAD EN MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATAS HIPERTIROIDEAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

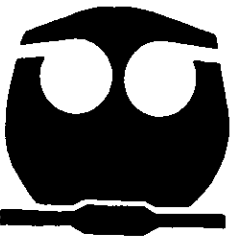
P R E S E N T A :

RAYMUNDO CARRILLO LIZALDI

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDMUNDO CHAVEZ COSIO

MEXICO, D. F.

2000



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre

Vocal Profa. Rebeca E. Franco Y Bourland

Secretario Prof. Edmundo Chávez Cosío

1° Suplente Prof. Javier Plasencia de la Parra

2° Suplente Profa. Ma. Elena Ibarra Rubio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Instituto Nacional de Cardiología " Ignacio Chávez "
Departamento de Bioquímica

Asesor:

Dr. Edmundo Chávez Cosío



Sustentante:

Raymundo Carrillo Lizaldi



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a **DIOS**, por todas las bendiciones que me ha dado a lo largo de mi vida.

A **Raymundo, Maria Eugenia, Mayra, Daniel y Gerardo**, porque juntos forman lo más preciado que tengo: mi familia. Gracias por el apoyo que me han dado para lograr mis metas y mi desarrollo personal.

Al Dr. **Edmundo Chávez** por guiarme en este gran mundo de la ciencia, por su gran paciencia y sus consejos para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. **Ana Cecilia Zazueta** y a **Noemí García**, por su amistad y el gran apoyo para la realización de este trabajo. De verdad muchas gracias.

Gracias a **Paco, Oscar, César Avilés, David, Norma, Marcela, Martha y César Sánchez**, por hacer agradable con su amistad y consejos la estancia en el laboratorio.

A mis amigos de la universidad **Omar, Gaby, Cecy y Horacio**, porque en el inicio de la carrera y aun fuera de ella, me han apoyado en todo momento.

A **Cyntia**, porque en este corto tiempo ha sido una gran amiga, que me ha impulsado y apoyado para terminar de escribir este trabajo.

A **Manuel, Claudia, Julieta, Manolo, Saúl y Marú** gracias por su amistad.

A mis amigos de toda la vida **Hugo, Fabiano, Alejandro, Antonio, Ernesto, Roberto, Mónica, Gerardo, Sirio, Daniel, Ana, Cira, Gelo, Angel, Quico, Chucho, Ricardo, Gabriel**, por hacer mi vida muy divertida. (Una disculpa a los que omití.)

Quiero hacer una mención muy especial para **Armando Esparza**. Amigo con todo tu empeño y con confianza en Dios, vas a salir adelante. Animo amigo se que es difícil pero cuentas con tu familia y amigos para salir adelante.

A la familia **Ruiz Cedillo**, por darme su amistad y cariño en momentos muy difíciles de mi vida y tratarme como si fuera parte de su familia. Siempre contarán incondicionalmente conmigo.

No se como agradecer a **Ricardo Jasso** su invaluable amistad. Aunque lo dudes amigo.

A **Roberto Ibarra**, a mi hermano del alma. Sabes que te extraño mucho, no sabes como me has hecho falta amigo. Esto es en tu memoria, cuidate donde quiera que estés.

A **Fernando Ibarra y Noemí**, por el gran apoyo en la realización de las figuras de este trabajo.

Gracias **Evy**, por ser mi amiga y compartir parte de tu vida conmigo. Espero que tus sueños se realicen.

Gracias a **Armando Frías**, que aunque el nunca se dio cuenta fue fundamental en un lapso de mi vida, muchas gracias amigo.

A **todos mis compañeros** del departamento de bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología, por el financiamiento de este trabajo a través del donativo 28666N.

Al Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", en el que se realizó el presente trabajo.

También quiero darles las gracias a **Lourdes y Sebastián**, por hacer feliz y ser la parte más importante de mi Hermano **Ariel Jiménez** a quien dedico este trabajo.

Gracias a mi amigo **Hoch**, que en estos últimos 5 años, me ha aguantado, me ha escuchado y ha sido mi fiel compañero.

Este trabajo se lo dedico a la persona más importante en estos largos 9 años, a la persona que nunca perdió la esperanza y confianza en mi. Nunca hubiera terminado este trabajo sin ella y sin su apoyo. Por darme su amor y amistad incondicional. Por no dejarme caer más y sacarme del abismo más profundo en el que he caído en mi vida. Por ayudarme a derrotar a la única persona que me pudo haber derrotado en mi vida, a mí mismo. Gracias por acercarme a DIOS y mostrarme todas sus bondades. De verdad muchas, muchas gracias a **DULCE**.

TA5.

INDICE

INTRODUCCIÓN	
- El calcio en la mitocondria.	5
- Transición de la permeabilidad.	7
- Influencia del hipertiroidismo en la mitocondria.	12
- Papel del potasio en la mitocondria.	15
OBJETIVO E HIPÓTESIS	17
MATERIAL Y MÉTODOS	
- Medios de trabajo.	18
- Inducción del hipertiroidismo.	18
- Aislamiento de mitocondrias.	19
- Acumulación de calcio.	20
- Determinación de grupos tioles.	20
- Determinación de malondialdehído.	21
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIÓN	50
REFERENCIAS	51

ABREVIATURAS

$\Delta\Psi$	Potencial de Membrana.
ANT	Translocador de Adenin Nucleótidos.
ADP	Adenosín Difosfato.
ATP	Adenosín Trifosfato.
CAT	Carboxiatractilósido.
C.R.	Control Respiratorio.
CSA	Ciclosporina A.
CyP-D	Ciclofilina D.
DTNB	Acido 5,5'-Ditio-bis (2-nitrobenzoico).
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGTA	Etilenglicol-bis-(β -aminoetil éter), Ácido N,N,N',N'-tetraacético.
HEPES	Ácido4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico.
MDA	Malondialdehído.
P _i	Fósforo Inorgánico.
ROS	Radicales Libres Derivados de Oxígeno.
TBA	Ácido Tiobarbutúrico.
T.P.	Transición de la Permeabilidad.
T ₃	Triiodotironina.
T ₄	Tiroxina.
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-prpanediol (Buffer).
VDAC	Canal Aniónico de la Membrana Dependiente de Voltaje.

INTRODUCCIÓN

EL CALCIO EN LA MITOCONDRIA

La participación del calcio en el metabolismo de los organismos vivos es muy importante. En su forma libre como ion, es en la cual adquiere mayor relevancia, debido a que participa promoviendo o inhibiendo reacciones en los sistemas biológicos. Algunas de las respuestas hormonales involucran la participación directa de este catión amplificando la señal en el interior de la célula, por lo que los rangos de la concentración de calcio libre deben ser finamente regulados a través de los diferentes sistemas de transporte membranales.

La concentración mitocondrial de cationes controla un gran número de funciones metabólicas. Se ha demostrado que la concentración de calcio libre dentro de la mitocondria $[Ca^{2+}]_m$, modula la actividad de algunas deshidrogenasas como la succinato deshidrogenasa, la NADH deshidrogenasa y la 3-fosfoglicerol deshidrogenasa (Goglia et al., 1999) en respuesta a las demandas energéticas en los tejidos.

Los sistemas de transporte de la membrana interna mitocondrial median separadamente la entrada y salida de calcio. La entrada de calcio es a través de un uniportador (U) apoyada por un potencial de membrana ($\Delta\Psi$) negativo en el interior, que deriva de la oxidación de sustratos a través de la cadena respiratoria o la hidrólisis de ATP por la F_1 ATPasa (Scarpa and Azzone 1970).

La liberación de Ca^{2+} se lleva a cabo por varios mecanismos: I) Mediante un intercambio electroneutro $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$ (D). Este mecanismo de salida se presenta preferentemente en mitocondrias de tejidos excitables como corazón y cerebro, que requieren una rápida respuesta metabólica (Crompton et al., 1976). II) A través de un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (I). Este mecanismo se presenta en mitocondrias de tejidos que requieren respuestas metabólicas menos rápidas como el hígado y el riñón (Fiskum and Cockrell,1978) y III) A través de una vía inespecífica activada por una acumulación masiva de Ca^{2+} más un agente inductor, (cuya naturaleza puede ser diversa) conocida como transición de la permeabilidad (T.P.).

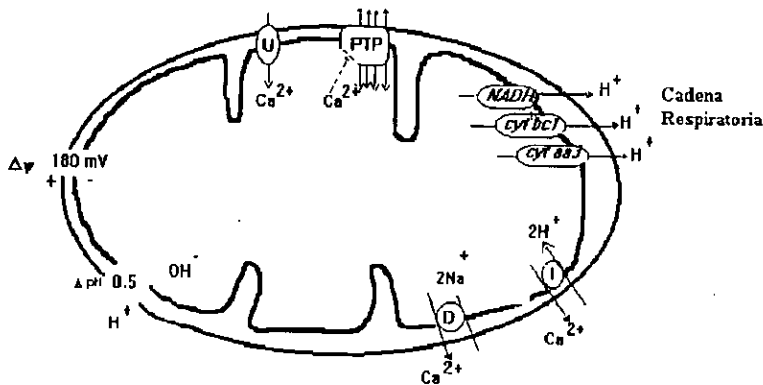


Figura N° 1 Representación de las proteínas involucradas en el transporte de calcio. D) Antiportador dependiente de Na. I) Antiportador independiente de Na. U) Uniportador de calcio. PTP) Poro de la transición de la permeabilidad. $\Delta\Psi$) potencial transmembranal.

TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD

En condiciones normales la mitocondria capta Ca^{2+} del medio. Para que este proceso se lleve a cabo, se requiere la presencia de ADP y P_i (Gunter and Pfeiffer, 1990). En esta condición las mitocondrias pueden acumular Ca^{2+} por un intervalo de tiempo mayor de 10 minutos. Sin embargo, la acumulación masiva de calcio más un agente inductor, causa la pérdida de la permeabilidad específica de la membrana convirtiéndose en una permeabilidad inespecífica. A este fenómeno se le conoce como transición de la permeabilidad (T.P.) (Gunter and Pfeiffer, 1990).

La transición de la permeabilidad es causada por la apertura de un poro cuya estructura no se conoce. Se propone que el translocador de adenín nucleótidos (ANT) tiene un papel importante en la formación del poro y que puede deberse a cambios en la conformación de la estructura del ANT (Halestrap and Davidson, 1990). El ANT cataliza el intercambio de ATP y ADP a través de la membrana interna. Esta proteína intrínseca fué de las primeras proteínas transportadoras que se purificaron. El ANT es de las proteínas más abundantes en la membrana interna con un peso de 30 KDa. Se ha propuesto al ANT como el poro de la transición debido a que la apertura del poro es altamente susceptible a los inhibidores y promotores de la actividad del ANT (Crompton 1999).

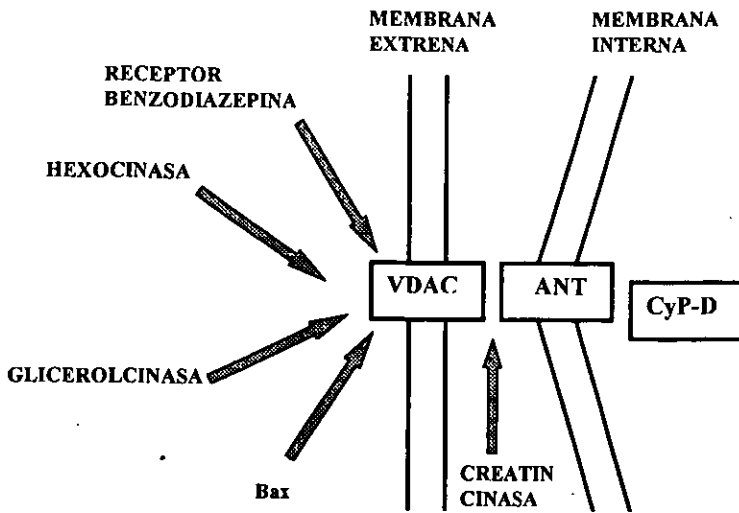


Figura N° 2 Probable estructura del poro de la transición de la permeabilidad.

Se ha propuesto que el poro debe de estar constituido además del ANT, de proteínas que aumenten la eficiencia del mismo. Se ha descrito que el ANT interactúa con una proteína de membrana externa llamada canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), la cual es una porina. Se ha reportado que el VDAC está unido al ANT. Esta descripción se realizó utilizando columnas de afinidad de glutatión transferasa (GST) y CyP-D (Halestrap et al., 1997). Además el ANT está unido a una proteína soluble de la matriz que también se ha encontrado en la fracción de membrana interna. Sugiriendo que la ciclofilina D (CyP-D) se asocia con la membrana interna, en especial con el ANT. Se ha descrito que la CyP-D se une al ANT aumentando la susceptibilidad para formar el poro de la transición, esta unión se favorece al existir oxidación de grupos tioles y estrés oxidativo (Halestrap et al., 1997).

poro de la transición, esta unión se favorece al existir oxidación de grupos tioles y estrés oxidativo (Halestrap et al., 1997).

Se ha descrito que el inmunosupresor ciclosporina A (CSA) se une a la CyP-D y provoca la inhibición en la apertura del poro. Por lo que se sugiere que para se inhiba la transición de la permeabilidad, es necesario que la CyP-D se una a la CSA. (Halestrap et al., 1997).

Existen otros inhibidores de la transición de la permeabilidad como el ADP y el ácido bongkrékico. Además también existen promotores de esta transición como el CAT y atractilósido. La transición de la permeabilidad se ha asociado con la orientación del ANT. Bajo este contexto los promotores de la transición de la permeabilidad estabilizan al ANT en conformación c (hacia el citosol). Por el contrario el ADP y el ácido bongkrékico inhiben la transición de la permeabilidad, ya que inmovilizan al ANT en orientación m (hacia la matriz) (Hunter et al., 1979). Esto sugiere que es necesario que el ANT adopte la conformación c para que se promueva la transición de la permeabilidad. Al inhibirse la transición de la permeabilidad las mitocondrias pueden retener el calcio dentro de su matriz.

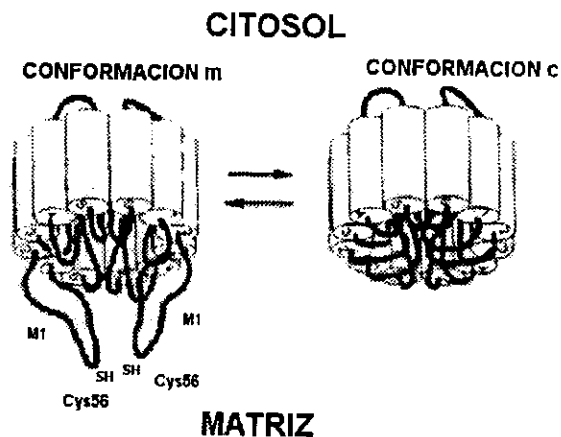


Figura N° 3 Orientación del Translocador de Adenín Nucleótidos. La conformación c, es la más favorable para la inducción de la transición de la permeabilidad.

En estudios de patch-clamp en mitoplastos se ha podido identificar un canal de alta conductancia, que se conoce como megacanal mitocondrial (Zoratti and Szabo, 1994). El megacanal y el ANT responden de la misma forma al efecto inhibitor del ácido bongkrékico y al efecto promotor del CAT de la transición de la permeabilidad. Esto confirma que cambios conformacionales del ANT llevan a la formación del poro de la transición de la permeabilidad.

Esta transición puede ser regulada por el pH intramitocondrial, que se favorece a pH altos y se inhibe a pH bajos (Bernardi and Petronilli, 1995).

La presencia de calcio más prooxidantes, incrementa la permeabilidad de la membrana interna. Este fenómeno es mediado por la unión del calcio a sitios específicos de la membrana (Valderez et al., 1993).

Se ha sugerido que estos sitios podrían ser los fosfolípidos de la membrana interna, particularmente con la cardiolipina (Vercesi et al., 1997).

En experimentos realizados en un medio que contenía KCl, se observó que al inhibir con rojo de rutenio, se requería más calcio para inducir el aumento de la permeabilidad. Esto enfatiza, el papel del calcio para promover el fenómeno de la transición de la permeabilidad (Gunter and Pfeiffer, 1990).

En la transición de la permeabilidad el potencial de membrana se abate (Åkerman, 1978). El decaimiento del potencial de membrana inducido por prooxidantes más calcio, puede revertirse parcialmente por el EGTA (Castilho et al., 1996). Si se añade catalasa el efecto del EGTA aumenta. Esto indica que el efecto del calcio es dentro de la mitocondria y que la oxidación de los componentes de la membrana, juega un papel importante en el abatimiento del $\Delta\psi$. Solo se logra la recuperación del potencial de membrana cuando se agrega ADP, por lo que se refuerza la participación del ANT en la transición de la permeabilidad.

INFLUENCIA DEL HIPERTIROIDISMO EN LA MITOCONDRIA

En el hipertiroidismo existe un incremento de las hormonas tiroideas T_3 y T_4 en la circulación sanguínea. Fernández y colaboradores (1993) reportaron concentraciones de T_3 de 53 ± 2 ng/dL para ratas eutiroideas y 320 ± 52 ng/dL para hipertiroides. Este incremento de hormonas altera la función mitocondrial, por el incremento en el contenido de algunas proteínas mitocondriales como el translocador de adenín nucleótidos (ANT), la citocromo oxidasa y la cardiolipina sintetasa (Schönfeld. et al., 1997). Esto se observó en geles de poliacrilamida por la incorporación de [35 S] metionina (Nelson et al., 1984). Además también se observó el aumento de fosfolípidos como la cardiolipina, que regula la actividad de la ANT y la citocromo oxidasa. En el hipertiroidismo se produce una mayor cantidad de radicales libres derivados del oxígeno, debido al incremento en el consumo de oxígeno. Esto a su vez induce mayor oxidación de grupos tioles (Castilho et al., 1996) y mayor lipoperoxidación (Fernández, 1996). Las mitocondrias de hígado de rata sometidas a un tratamiento con 3,5,3'-triiodotironina (T_3) en presencia de calcio exógeno, presentan aumento en la permeabilidad de la membrana interna, que se traduce en hinchamiento mitocondrial, disminución del potencial de membrana ($\Delta\psi$) y salida rápida de calcio. Estos efectos son dependientes de las concentraciones utilizadas de T_3 y Ca^{2+} (Castilho et al., 1998). Los análogos de la T_3 como la tiroxina (T_4), 3',5'-diodotironina (T_2), y la 3,5',3'-triiodotironina (T_3 inversa), presentan en orden decreciente los mismos efectos que la T_3 . (Castilho et al., 1998).

En las mitocondrias hipotiroideas el metabolismo disminuye, así como el área de la membrana interna mitocondrial (Jakovic et al., 1978) y el consumo del oxígeno (Giuseppe et al., 1993). Cuando se tratan con T_3 a las mitocondrias hipotiroideas, estos parámetros se normalizan, teniendo valores cercanos a los de las mitocondrias eutiroideas. Esto datos confirman que la T_3 influye sobre la estructura y el metabolismo mitocondrial. En experimentos realizados con succinato como sustrato oxidable, las mitocondrias hipotiroideas tienen una velocidad en los estados 3 y 4 de la respiración de 13 ± 0.4 y 46 ± 1.2 ng átomo de oxígeno/min/ mg de proteína respectivamente. Cuando las ratas hipotiroideas son tratadas con T_3 (20 μ g por tres días), la velocidad de los 2 estados se incrementa a 31 ± 2.3 y 100.7 ± 12.1 ng átomo de oxígeno/min/ mg de proteína, casi recuperándose los valores observados en ratas eutiroideas (Nelson et al., 1984).

El aumento en el consumo de oxígeno inducido por la T_3 , incrementa los niveles de malondialdehído (MDA). En el hipertiroidismo, los valores de MDA se incrementan significativamente. Se ha reportado que en homogenados de hígado de rata hipertiroideas, la concentración es de 75.70 ± 3.77 nmol de MDA / g de tejido, comparado con los homogenados de hígado de ratas eutiroideas que tienen un valor de 41.31 ± 2.89 nmol de MDA / g de tejido. Esto indica de manera indirecta la elevación en la producción de radicales libres en el hipertiroidismo.

Por otra parte, en hígado de ratas hipertiroideas, la producción de sustancias atraparoras de radicales libres, como la vitamina E, se incrementa en respuesta al estrés oxidativo que se genera en este estado (Venditti et al., 1997). Este incremento no es suficiente para proteger de los radicales libres, ya que no

pueden ser eliminados por los sistemas antioxidantes. Además en el hipertiroidismo se ha medido una disminución en la actividad de la súper oxido dismutasa. Debido a esto, la oxidación de lípidos y proteínas de las membranas es mayor en las mitocondrias aisladas de animales hipertiroides que en las mitocondrias aisladas de animales eutiroides.

Con respecto a la estructura de la membrana interna se ha observado que durante la transición de la permeabilidad mitocondrial, existe un aumento en la formación de agregados producto del entrecruzamiento de grupos tioles entre proteínas. En geles de poliacrilamida, se ha observado un incremento en las proteínas de alto peso molecular, proporcional a una disminución de las proteínas de bajo peso molecular (Valderez et al., 1993).

Como se ha mencionado la concentración de calcio libre intramitocondrial es crítica para que se establezca la transición de la permeabilidad, dicha concentración podría estar relacionada con la densidad de cargas negativas de la membrana, que es controlada por la concentración de cationes, entre ellos el potasio que es el catión monovalente más abundante en la mitocondria.

PAPEL DEL POTASIO EN LA MITOCONDRIA

Cuando la entrada y salida de potasio están fuera de balance, el resultado de la entrada neta de potasio es acompañada por un flujo electroneutro de aniones y agua provocando el hinchamiento de la mitocondria.

El potasio puede entrar a la mitocondria a través de un uniportador específico localizado en la membrana interna. La entrada de potasio se lleva a cabo a través de un mecanismo saturable unidireccional, que es inhibido por Mg^{2+} (Garlid et al., 1984). Se ha sugerido que el calcio libre intramitocondrial estimula la actividad del uniportador de potasio (Halestrap et al., 1986).

El ciclo del potasio en la mitocondria, esta regulado por de dos mecanismos, uno de entrada a través de un uniportador y uno de salida, a través de un antiportador K^+/H^+ . El ciclo del potasio es dependiente de la respiración (Garlid, 1996).

Un factor en el incremento de la permeabilidad mitocondrial es el aumento en la concentración de potasio dentro de la mitocondria. Se ha demostrado que hay poco intercambio de $^{42}K^+$ con el K^+ endógeno en mitocondrias de hígado de rata, indicando la impermeabilidad de la membrana interna a este catión (Korotkov et al., 1998). Garlid (1984) propuso que el Mg^{2+} intramitocondrial regula la actividad del antiportador K^+/H^+ . Al disminuir la concentración de Mg^{2+} la actividad del antiportador también disminuye. El incremento en la concentración de potasio dentro de la mitocondria favorece la pérdida de la permeabilidad específica. La

estimulación del calcio en la entrada del potasio puede ser directa o indirecta sobre el uniportador de potasio.

En mitocondrias depletadas de potasio la concentración de calcio libre intramitocondrial disminuyó (Chávez et al., 1991). Además el calcio libre en la matriz es necesario para la acción de otros agentes inductores de la transición de la permeabilidad, como el CAT (Chávez et al., 1991). Por lo que se ha propuesto que el potasio tiene un papel importante en la regulación del calcio libre en la matriz mitocondrial.

La entrada de los cationes es el factor más importante en el incremento de la permeabilidad. La apertura del canal de aniones (IMAC) localizado en la membrana interna es inducida en presencia de Zn^{2+} (Korotkov et al., 1997). En conexión con esto se puede sugerir que el aumento en la permeabilidad puede ser inducido por el calcio intramitocondrial, permitiendo no solo la entrada de K^+ sino también la de Cl^- , ya que el potasio tiene un papel importante en control del volumen mitocondrial.

En este trabajo presentamos datos que demuestran que el potasio es un factor esencial en el establecimiento de la transición de la permeabilidad en mitocondrias de hígado de ratas hipertiroideas.

HIPÓTESIS

La interacción del potasio con los fosfolípidos de la membrana interna mitocondrial de ratas hipertiroideas, afectaría la concentración de calcio libre en la matriz mitocondrial, necesaria para promover la transición de la permeabilidad en las mitocondrias.

OBJETIVO

Determinar si el potasio es necesario para promover la transición de la permeabilidad en las mitocondrias de hígado de ratas hipertiroideas.

MATERIAL Y METODOS

MEDIOS DE TRABAJO

El medio de aislamiento contenía 250 mM de sacarosa; 10 mM de Tris y 1mM de EDTA. El pH del medio se ajustó a 7.3. El medio A contenía 125 mM de KCl; 10 mM succinato; 10 mM HEPES; 2 mM fosfato. En el medio B se cambió el KCl por sacarosa 250 mM y la concentración de fosfato fue de 4 mM, los dos medios se ajustaron a un pH de 7.3. La concentración de proteína mitocondrial se midió por el método de biuret (Gornall et al., 1949), utilizando como estándar albúmina sérica bovina sin ácidos grasos (10 mg / ml).

INDUCCIÓN DEL HIPERTIROIDISMO

El hipertiroidismo se indujo con triiodotironina inyectada en ratas macho Wistar de 250 gramos de peso, que se mantuvieron en el bioterio con agua y comida *ad libitum* y a temperatura ambiente. Después de la inyección de la última dosis del tratamiento, se les retiró el alimento a las ratas toda la noche, con el propósito de bajar la concentración de ácidos grasos libres en la circulación sanguínea. La dosis utilizada fue de 2 mg / kg de peso por vía intraperitoneal. El tratamiento fue durante 5 días consecutivos. Al sexto día de haber comenzado el tratamiento, se sacrificaron a los animales y se les extrajo el hígado para el aislamiento de las mitocondrias.

AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

Las mitocondrias se aislaron cortando el hígado en pedazos muy pequeños y homogeneizando el tejido suavemente con el medio de aislamiento. El aislamiento se realizó por el método de centrifugación diferencial, que consiste en una centrifugación a 2500 r.p.m. durante 10 minutos a 4° C, el botón resultante de la centrifugación se descartó. El sobrenadante se filtró con una gasa, después se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 10 minutos a una temperatura de 4° C. El botón se resuspendió suavemente con un pincel y se incubó con BSA al 0.2 % durante 10 minutos (el medio en el que se disolvió, fué el medio de aislamiento con una concentración de EDTA de 0.5 mM). Este sobrenadante se centrifugó nuevamente a 10,000 r.p.m., durante 10 minutos a una temperatura de 4° C. El botón final se resuspendió en el mismo medio de aislamiento, solo que la concentración del EDTA en el medio se cambió a 0.5 mM.

Los movimientos de calcio se siguieron espectrofotométricamente a 675-685 nm utilizando el indicador metalocrómico Arsenazo III (Scarpa et al., 1978). El potencial de membrana se midió espectrofotométricamente a 554-524 nm utilizando safranina como indicador (Åkerman et al., 1976). El hinchamiento se midió por el cambio en la densidad óptica a 540 nm. Estas determinaciones se realizaron utilizando los dos medios de trabajo. El consumo de oxígeno se midió por oximetría. Para ello utilizamos 1.2 mg de proteína mitocondrial y 2 mL del

medio A de trabajo, con agitación constante. La estimulación del estado 3 se realizó agregando 300 nmol de ADP.

ACUMULACIÓN DE CALCIO

La acumulación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, se midió por medio de la técnica de filtración con membranas Millipore de 0.45 micras. A 3 mL medio A de trabajo, se adicionaron 2 mg de proteína mitocondrial, se adicionó 50 μM de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ con actividad específica de 421 cpm/nmol. Se incubó la muestra en intervalos de tiempo de 2 a 6 minutos. Transcurrido el tiempo se tomó una alícuota de 200 μL de cada tiempo, se filtró al vacío, se lavó con KCl 0.1 M y se contaron las muestras.

DETERMINACIÓN DE GRUPOS TIOLES

En 2.9. mL de medio A se adicionó 2 mg de proteína mitocondrial, se agregó 100 μM de DTNB, se incubó la muestra durante 10 minutos, transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos y se leyó el sobrenadante a 412 nm. Se preparó una curva de calibración con cisteína.

CURVA DE CALIBRACIÓN

TUBO	nmoles	ABSORBANCIA
1	BLANCO	0
2	10	0.143
3	15	0.226
4	20	0.307
5	30	0.447
6	35	0.526

$$b = -1.2 \times 10^{-3}$$

$$m = 0.015$$

$$r = 0.9997$$

DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO

En un tubo de plástico se agregaron 2 mg de proteína mitocondrial y se llevaron a un volumen de 1.2 mL con el medio A. Las muestras se incubaron a 37 °C con agitación durante 10 minutos, la reacción se detuvo con 1.5 mL de ácido acético al 20% (pH 2.5). Se agregó 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.8% (éste debe utilizarse fresco y se disuelve con agua caliente que no exceda los 56 °C, bajo agitación constante). Las muestras se calentaron a ebullición en baño María durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo las muestras se pusieron en hielo.

Después se agregó 1.0 mL de KCl al 2% y 5 mL de butanol/piridina (15:1), se taparon las muestras y se agitaron vigorosamente. Se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se leyó a 532 nm. Se preparó una curva de calibración con malondialdehído.

CURVA DE CALIBRACIÓN

TUBO	nmol	ABSORBANCIA
1	BLANCO	0
2	0.2	0.011
3	0.4	0.022
4	0.6	0.030
5	0.8	0.038
6	1.0	0.048
7	1.5	0.057
8	2.0	0.100

$$b = 1.3 \times 10^{-3}$$

$$m = 0.045$$

$$r = 0.9983$$

RESULTADOS

EFFECTO DEL HIPERTIROIDISMO EN LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL

Indujimos el hipertiroidismo con la inyección de triiodotironina por vía intraperitoneal. Esto basados en trabajos previos (Nelson et al., 1984, Fernández et al., 1993). En este trabajo probamos diferentes dosis y tiempos de tratamiento. Los mejores resultados los obtuvimos con la dosis de 2 mg/Kg de peso y 5 días de tratamiento. Los pacientes hipertiroides presentan disminución de peso aun con una ingesta normal o aumentada de alimento. En las ratas, este tratamiento provocó la disminución de peso. Los animales que utilizamos para realizar los experimentos, tenían un peso de 190 ± 10 g. Este parámetro nos ayudó a suponer que el estado hipertiroides se estableció en nuestro modelo de experimentación. Para confirmar si el hipertiroidismo se estableció y afectó la permeabilidad de la membrana interna, se midió la salida de calcio con arsenazo III. La salida de calcio indica el establecimiento de la transición de la permeabilidad inducida por el hipertiroidismo. El hipertiroidismo promueve la generación de una mayor cantidad de ROS, que reaccionan con los lípidos y proteínas de la membrana interna, alterando la estructura y la conformación de la membrana interna. Estas alteraciones posiblemente promuevan el establecimiento de la transición de la permeabilidad. Las mitocondrias de ratas control en presencia de una alta concentración de calcio exógeno ($100\mu\text{M}$), no presentaron cambios en la

permeabilidad de la membrana interna. El calcio se acumula y permanece dentro por un periodo de más de 10 minutos (figura 5B). Por el contrario las mitocondrias de ratas hipertiroideas presentaron una rápida salida de calcio (figura 5A). Con este resultado y la disminución de peso podemos afirmar que las ratas eran hipertiroideas. Esto concuerda con trabajos previos (Fernández et al., 1993, Castilho et al., 1998,), en los que se reporta que para promover la transición de la permeabilidad debe haber una alta concentración de calcio y un agente inductor, que en nuestro caso fue el estado hipertiroideo.

EFFECTO DEL HIPERTIROIDISMO EN LA PERMEABILIDAD DE LA
MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL

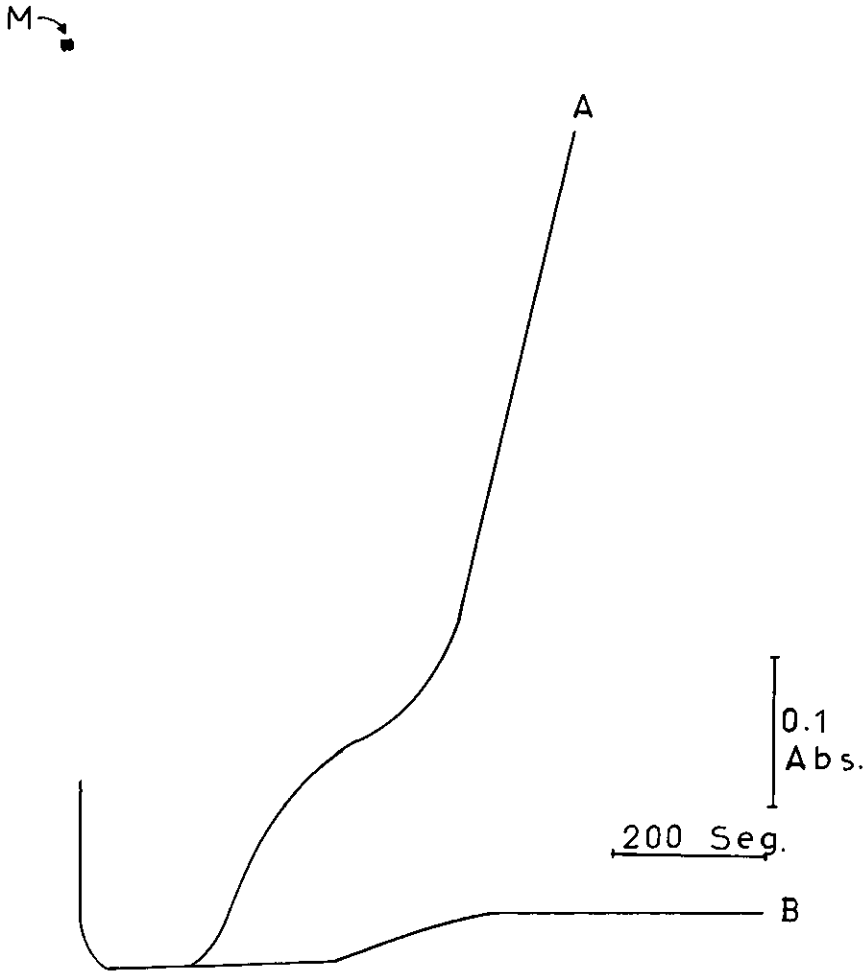


Figura 5. Efecto del hipertiroidismo en la permeabilidad de la membrana interna.

Mitocondrias (M: 2 mg de proteína), se adicionaron a 3 mL de medio A que contenía: 125 mM de KCl; 10 mM de succinato; 10 mM de HEPES; 2 mM de fosfato; 200 μ M de ADP; 10 μ g de rotenona; 100 μ M de arsenazo III; 100 μ M de CaCl_2 ; agitación y oxigenación continua. A) Mitocondrias hipertiroideas, B) Mitocondrias control. La salida de calcio se observa cuando sube el trazo.

EFFECTO DEL HIPERTIROIDISMO EN LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

En los pacientes hipertiroideos se incrementa el metabolismo. Esto lleva al aumento del consumo de oxígeno para satisfacer las demandas energéticas del paciente. Por lo que al medir el consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas de animales hipertiroideos podemos saber si el hipertiroidismo afecto a las mitocondrias por la mayor producción de ROS.

En la tabla 1 observamos que las mitocondrias hipertiroideas presentaron un incremento en la velocidad de consumo de oxígeno. Los estados 3 y 4 tuvieron mayor velocidad de consumo de oxígeno (200 y 60 ng átomo de O/min/mg proteína respectivamente) que las mitocondrias control (185.4 y 41.6 ng átomo de O/min/mg proteína). El control respiratorio (C.R.) nos indica el grado de acoplamiento entre la fosforilación oxidativa y la cadena respiratoria en ambos tipos mitocondriales.

Un buen acoplamiento es el reflejo de la integridad de la membrana interna. Las mitocondrias hipertiroideas tuvieron un C.R de 3.3 con ADP/O de 1.35 y en las mitocondrias control de 4.5 con un ADP/O de 1.87. Con este resultado podemos concluir que las mitocondrias hipertiroideas fueron dañadas debido probablemente al aumento de ROS. Al aumentar el consumo de oxígeno se producen más radicales libres derivados del oxígeno.

Estos radicales libres superan a los mecanismos antioxidantes de protección, por lo que la mitocondria se daña y se modifica su fisiología. El aumento de ROS genera estrés oxidativo en el cual existe mayor oxidación de los lípidos y proteínas de la membrana.

Debido a la oxidación de los componentes de la membrana interna puede haber modificaciones en su estructura promoviendo la transición de la permeabilidad en las mitocondrias hipertiroideas.

**EFFECTO DEL HIPERTIROIDISMO EN LA RESPIRACIÓN
MITOCONDRIAL**

	C	T₃
Estado 3 ng átomo de oxígeno/min/mg proteína	185.4	200
Estado 4 ng átomo de oxígeno/min/mg proteína	41.6	60
Control Respiratorio	4.45	3.3
ADP/O	1.87	1.35

Tabla 1 Efecto del hipertiroidismo en la respiración mitocondrial.

1.2 mg de mitocondrias se adicionaron a 2 mL de medio que contenía 125 mM de KCl; 10 mM de succinato; 10 mM de HEPES; 2 mM de fosfato; 10 µg de rotenona y agitación continua. Se adicionaron 300 nmol de ADP para estimular el estado 3. Se observó un aumento en la velocidad de los estados 3 y 4 de las mitocondrias hipertiroides.

OXIDACIÓN DE LÍPIDOS DE LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL

En el hipertiroidismo existe mayor oxidación de los lípidos (lipoperoxidación) de la membrana interna (Fernández et al.,1985). Al medir el aumento de malondialdehído, que es un producto de la lipoperoxidación, podemos inferir que existe un incremento de radicales libres, los cuales provocan daño en la membrana. En la tabla 2 observamos el incremento en la producción de malondialdehído (0.62 nmol de MDA / mg de proteína) en las mitocondrias hipertiroideas. Esto con respecto a las mitocondrias control (0.46 nmol de MDA / mg de proteína). Se sabe que en el hipertiroidismo existe una mayor cantidad de ROS, los cuales reaccionan con las dobles ligaduras de los ácidos grasos de los lípidos de la membrana interna. Al reaccionar con estas dobles ligaduras se pueden formar dos fragmentos de ácidos grasos, cada uno de los cuales es un radical libre. Estos radicales libres tienen la capacidad de atacar a los dobles enlaces de otro ácido graso, lo que incrementa la producción de malondialdehído. Los resultados muestran que existió mayor lipoperoxidación en las mitocondrias hipertiroideas. Esta lipoperoxidación pudo provocar cambios en la conformación de la membrana, cambiando su estructura y su fluidez. Estos cambios probablemente promueven la transición de la permeabilidad. Al existir mayor proporción de proteínas en la membrana interna, éstas también pueden ser blanco de los radicales libres. Ya que los ROS son producidos en la cadena respiratoria y su tiempo de vida media es muy corto, reaccionan casi en el sitio donde son producidos.

PRODUCCIÓN DE MALONDIALDEHÍDO

	nmol de malondialdehído / mg de proteína mitocondrial
TRIIODOTIRONINA	0.62 ± 0.04 (7)
CONTROLES	0.46 ± 0.07 (5)

nmol de malondialdehído ± D.E. (n)

Tabla 2 El efecto del hipertiroidismo en la producción de malondialdehído. Las condiciones experimentales se detallan en material y métodos.

OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA INTERNA

La oxidación de los grupos tioles de las proteínas de la membrana interna se debe principalmente a la acción de los ROS. En el hipertiroidismo la producción de estos aumenta, ya que no pueden ser eliminados por los sistemas antioxidantes de protección (Venditti et al., 1997). El aumento de la permeabilidad de la membrana interna se ha asociado también con la oxidación de los grupos tioles de las proteínas (Valderez et al., 1993).

La tabla 3 muestra la oxidación de los grupos tioles en las proteínas mitocondriales. Como se observa, las mitocondrias control tienen mayor cantidad de grupos tioles, indicándonos que existe menor oxidación de grupos tioles. Por el contrario, las mitocondrias hipertiroideas mostraron una disminución en la cantidad de grupos tioles, debido a la gran cantidad de ROS producidos en el estado hipertiroideo.

Esta oxidación puede estar relacionada con cambios conformacionales de las proteínas membranales, lo cual probablemente promueva la transición de la permeabilidad.

OXIDACIÓN DE GRUPOS TIOLES

	nmol de grupos tioles / mg de proteína
TRIIODOTIRONINA	13.90 ± 0.56 (3)
CONTROLES	16.90 ± 0.16 (3)

nmol de tioles ± D.E. (n)

Tabla 3 Oxidación de los grupos tioles de las proteínas mitocondriales.

Las condiciones experimentales se detallan en material y métodos.

ACUMULACIÓN DE CALCIO

La acumulación de calcio nos indica la integridad de la membrana interna, las mitocondrias que presenten daño no podrán acumular calcio. Al utilizar calcio radioactivo, podemos medir las emisiones de este dentro de las mitocondrias y saber que cantidad de calcio acumularon.

La tabla 4 muestra la acumulación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en mitocondrias control e hipertiroideas. Se muestra que las mitocondrias control pueden mantener mayor cantidad de calcio dentro de ellas, por no estar dañada la membrana interna. Las mitocondrias hipertiroideas no pueden acumular el calcio que entra a su matriz, debido al daño que sufre la membrana interna. Este cambio en la permeabilidad de específica a inespecífica, puede deberse a la oxidación de los componentes de la membrana interna por los ROS.

Un factor fundamental para la promoción de la T.P., es el calcio libre en la matriz mitocondrial. El calcio libre está regulado por varios factores. Uno de estos factores es la concentración de otros cationes en la matriz. El catión monovalente más abundante es el potasio, por lo que la concentración de potasio debe de ser fundamental en la regulación de calcio libre, que promueve la transición de la permeabilidad.

ACUMULACIÓN DE CALCIO

	C	T ₃
TIEMPO	nmol ⁴⁵ Ca ²⁺ /mg de proteína	nmol ⁴⁵ Ca ²⁺ /mg de proteína
2 min.	45.49 ± 10.20 (4)	33.90 ± 9.13 (4)
4 min.	45.85 ± 8.14 (4)	39.94 ± 7.45 (4)
6 min.	49.48 ± 11.94 (4)	26.69 ± 9.32 (4)

Tabla 4 Acumulación de calcio. Las condiciones experimentales se detallan en material y métodos.

INFLUENCIA DEL POTASIO EN LA TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD

La figura 6 muestra la transición de la permeabilidad en mitocondrias hipertiroideas incubadas en el medio A (trazo A). En contraste esta transición no se promueve en mitocondrias hipertiroideas incubadas en el medio B (trazo B). Estas mitocondrias se comportan como las mitocondrias control (trazo C), lo que nos indica que el potasio es un factor necesario para que se promueva la transición de la permeabilidad.

Para demostrar lo anterior, a las mitocondrias hipertiroideas incubadas en el medio B (figura 7), se les adiciono 40 mM de potasio (trazo A). Observamos que con esta adición se indujo la transición de la permeabilidad, esto se ve reflejado en la salida de calcio. Por otra parte, las mitocondrias hipertiroideas a las que no se les agregó potasio (trazo B) no presentaron salida de calcio, siguiendo el comportamiento de las mitocondrias control (trazo C). Este resultado corrobora la importancia del potasio en la transición de la permeabilidad.

Para saber a qué concentración el potasio promueve la transición de la permeabilidad, realizamos determinaciones de salida de calcio con diferentes concentraciones de potasio (figura 8). Observamos que a medida que la concentración de potasio va aumentando (hasta 40 mM), la velocidad de salida de calcio aumenta, lo que indica que la concentración de potasio es importante en la regulación del calcio libre, que promueve la transición de la permeabilidad.

INFLUENCIA DEL MEDIO EN LA TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD

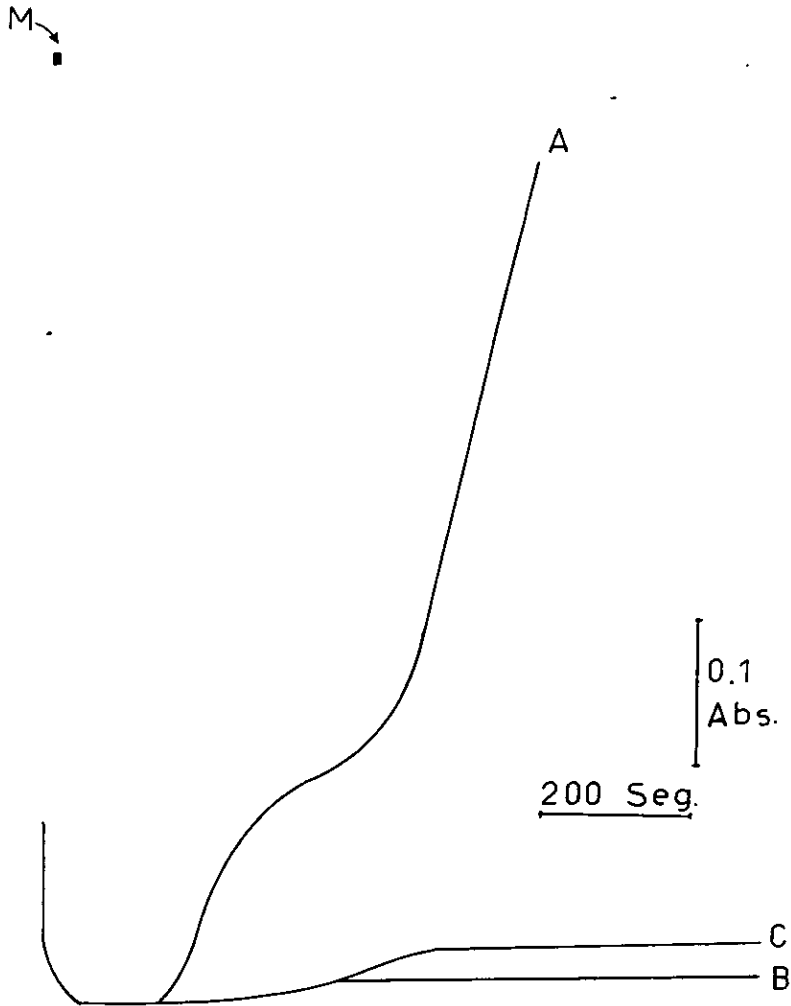


Figura 6 Influencia del medio en la transición de la permeabilidad. Se adicionaron 2 mg de mitocondrias en 3 mL de medio A o B (descritos en material y métodos), se adicionaron 100 μM de CaCl_2 , 200 μM de ADP, 10 μg de rotenona y 100 μM de arsenazo III. A) Mitocondrias hipertiroideas incubadas en el medio A. B) Mitocondrias hipertiroideas incubadas en el medio B. C) Mitocondrias control incubadas en el medio A.

INFLUENCIA DEL POTASIO EN LA TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD

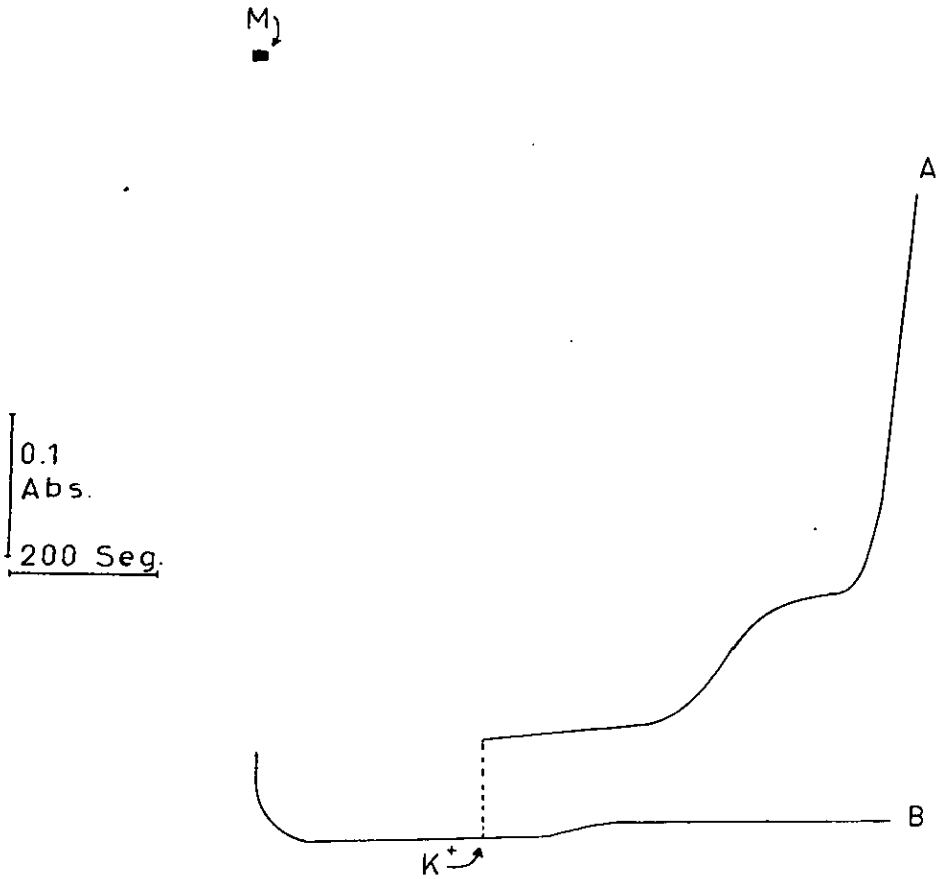


Figura 7 Influencia del potasio en la transición de la permeabilidad.

Se utilizaron las mismas condiciones que en la figura 6, excepto que solo se utilizó el medio B y se adicionó 40 mM de potasio donde se indica. A) Mitocondrias hipertiroideas más potasio. B) Mitocondrias hipertiroideas sin potasio. Se observa que el potasio es un elemento importante para establecer la transición de la permeabilidad en mitocondrias hipertiroideas.

INLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE POTASIO EN LA TRANSICIÓN DE
LA PERMEABILIDAD

M₂

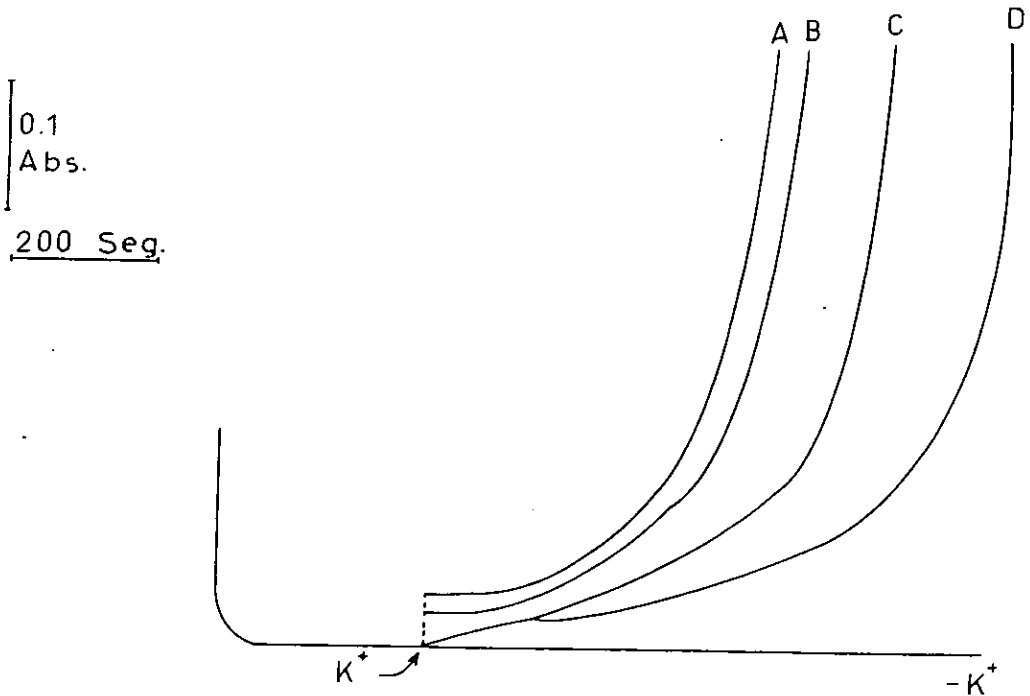


Figura 8 Influencia de la concentración de potasio en la transición de la permeabilidad.

Utilizando las mismas condiciones que en la figura 7 se fue incrementando la concentración de potasio de 0 hasta 40 mM. A) 40 mM. B) 20 mM. C) 10 mM. D) 5 mM. Se observa que a medida que aumenta la concentración la salida de calcio es mayor.

INFLUENCIA DEL HIPERTIROIDISMO EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA EN MITOCONDRIAL

Una característica de la transición de la permeabilidad es el decaimiento del potencial de membrana. La eficiencia del hipertiroidismo más Ca^{2+} para inducir la transición de la permeabilidad, se analizó por el mantenimiento del potencial de membrana. Es necesario un potencial de membrana negativo (-180mV), para mantener el calcio dentro de la mitocondria (Gunter and Pfeiffer, 1990).

En mitocondrias hipertiroideas incubadas en un medio con potasio más una alta concentración de calcio (trazo A), el potencial de membrana se abate (figura 9) Al establecerse la transición de la permeabilidad existe la entrada inespecífica de solutos (Kowaltowski et al., 1998).

Esta entrada rompe el equilibrio de cargas existentes en la matriz, por lo que no se puede mantener el ambiente negativo de la matriz, necesaria para mantener al calcio en la mitocondria. En las mitocondrias hipertiroideas incubadas en medio con sacarosa (trazo B), el potencial de membrana no se abate, ya que no se estableció la transición de la permeabilidad.

Esto posiblemente fue por la disminución de la concentración necesaria de calcio libre en la matriz, para promover la Transición de la permeabilidad. El potencial de membrana de las mitocondrias hipertiroideas incubadas en un medio con sacarosa se comporta como el de mitocondrias control (trazo C).

El que las mitocondrias hipertiroideas incubadas en sacarosa no presenten aumento en la permeabilidad refuerza la importancia del potasio sobre la

transición de la permeabilidad, por lo que a las mitocondrias hipertiroideas incubadas en sacarosa se les adicionó potasio (40 mM).

Al adicionar potasio al medio B se observó que el potencial de membrana se abatió comportándose como las mitocondrias incubadas en el medio A. Esto nos indica que no se estableció la transición de la permeabilidad en las mitocondrias hipertiroideas incubadas en sacarosa, debido probablemente a la disminución de calcio intramitocondrial. Al no haber calcio en exceso no se promueve la transición de la permeabilidad.

INFLUENCIA DEL HIPERTIROIDISMO EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA

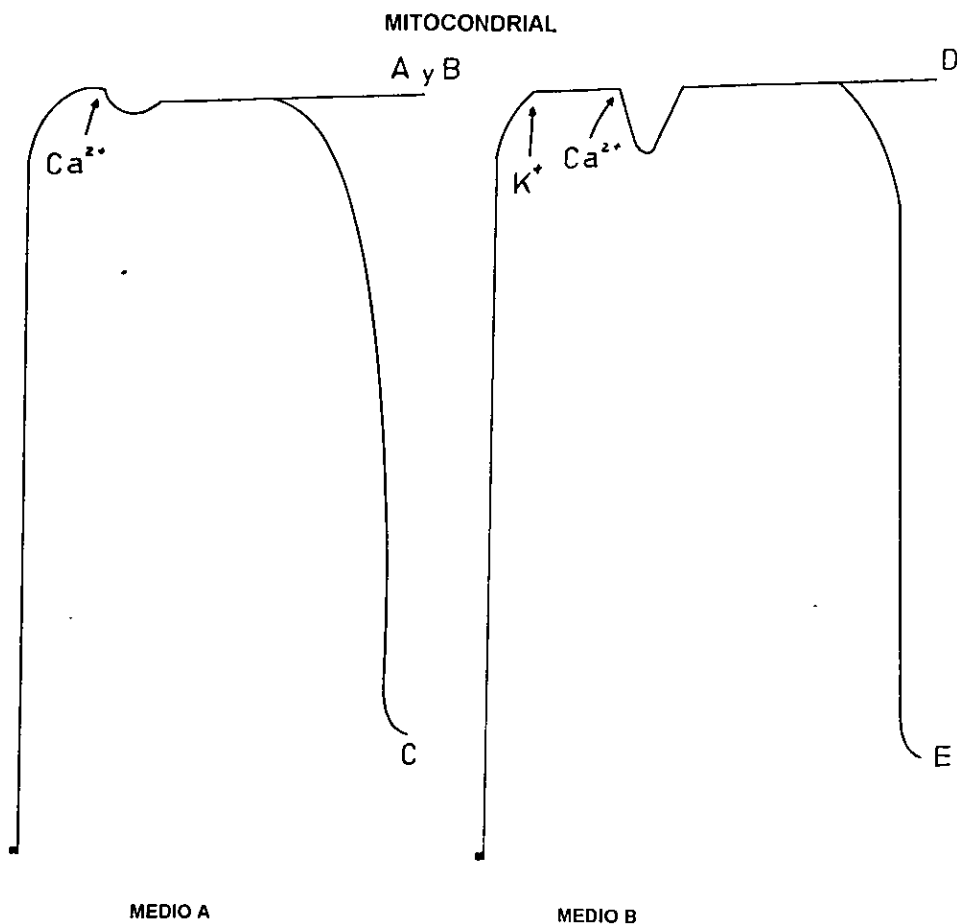


Figura 9 Influencia del hipertiroidismo en el potencial de membrana mitocondrial.

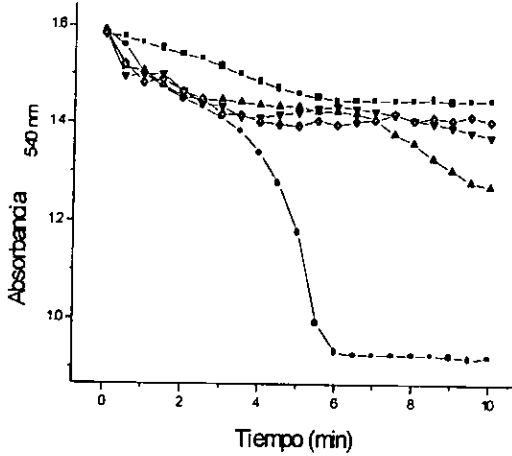
Las condiciones de experimentación son las mismas que en la figura 5, excepto que se cambió el arsenazo III por safranina (10 μ M). A) Control B) T₃ en medio B. C) T₃ en medio A. D) Control en medio B. E) T₃ en medio B más potasio. El abatimiento del potencial de membrana se observa en mitocondrias hipertiroides incubadas en el medio A. Se adiciona 40 mM de potasio y 100 μ M de Ca²⁺. El abatimiento del potencial se observa cuando baja el trazo.

HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL

Para saber si el potasio entra a la mitocondria e influye en la concentración de calcio libre, se siguió la disminución de la absorbancia en una suspensión de mitocondrias incubadas en los dos medios de trabajo. La entrada de una alta concentración de potasio a la mitocondria, ocurre por el aumento de la permeabilidad de la membrana. El potasio es un regulador del volumen mitocondrial (Garlid, 1996), ya que además de este catión entran agua y P_i para compensar las cargas positivas, por lo que las mitocondrias aumentan de volumen.

En la figura 10 observamos que las mitocondrias hipertiroideas incubadas en el medio con potasio más calcio, presentaron hinchamiento, debido a que se promovió la transición de la permeabilidad. La presencia del potasio posiblemente incremente el calcio libre, necesario para promover la transición de la permeabilidad. Por otro lado el calcio libre, puede estar estimulando la actividad del uniportador de potasio. Las mitocondrias hipertiroideas incubadas en sacarosa, no presentan hinchamiento, esto posiblemente sea por la disminución del calcio libre. Al disminuir el calcio libre, no se promueve la transición de la permeabilidad. Proponemos esto último, porque las mitocondrias hipertiroideas incubadas en el medio con potasio, a las que no se les adicionó calcio, no presentaron hinchamiento. Concluimos que es necesario que exista una alta concentración de calcio libre para que las mitocondrias se hinchen por la transición de la permeabilidad.

HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL



- Control en medio con potasio más calcio
- Hipertiroideas en un medio con potasio más calcio
- ▲— Hipertiroideas en medio con sacarosa más calcio
- ▼— Hipertiroideas en medio con potasio sin calcio
- ◆— Controles en un medio con potasio sin calcio

Figura 10 Efecto del hipertiroidismo en el hinchamiento mitocondrial.

Mitocondrias (2 mg de proteína) se adicionaron a los medios A y B (descritos en material y métodos), se utilizaron las mismas condiciones que en la fig 1 excepto que no se utilizó arsenazo III. Se observa que las mitocondrias hipertiroideas incubadas en el medio A, presentan hinchamiento, mientras que las que se incubaron en medio B no presentaron hinchamiento

DISCUSIÓN

En este trabajo mostramos la influencia del potasio en el establecimiento de la transición de la permeabilidad en mitocondrias de ratas hipertiroideas. Este cambio en la permeabilidad de la membrana interna de específica a inespecífica altera la concentración de cationes de la matriz mitocondrial. La alteración de cationes provoca cambios importantes en el transporte de calcio, en el potencial de membrana y en el volumen mitocondrial.

Sabemos que se estableció la T.P. en las mitocondrias de hígado de animales hipertiroideos ya que en estas mitocondrias se observó la liberación de calcio (figura 5). La liberación de calcio fue provocada por el daño causado por los ROS en la membrana interna. Al haber daño en la membrana interna, se altera la permeabilidad dejando pasar libremente solutos de la matriz al citosol y viceversa. Entre estos solutos se encuentra el calcio. La entrada de calcio provoca el colapso del potencial de membrana, ya que se rompe el equilibrio de cargas existente entre el interior y el exterior de la mitocondria. Este potencial no se puede restablecer en las mitocondrias hipertiroideas ya que la membrana interna esta dañada y deja pasar libremente al calcio (figura 5).

El potencial de membrana se restablece en las mitocondrias control, ya que la membrana interna de estas mitocondrias no presenta daños y puede equilibrar nuevamente las cargas, restableciendo el potencial negativo por el bombeo de protones que realiza la cadena respiratoria.

El potencial de membrana es necesario para el funcionamiento de los sistemas acarreadores de la mitocondria, entre los que se encuentra el sistema de

transporte del calcio. Se ha propuesto que el calcio aumenta la actividad de otros acarreadores (Halestrap et al., 1986), uno de estos acarreadores podría ser el acarreador de potasio. El potasio es un regulador del hinchamiento mitocondrial (Brierley et al., 1994). El aumento de Ca^{2+} , la disminución de la actividad del antiportador K^+/H^+ y la disminución de Mg^{2+} intramitocondrial (Garlid, 1996), aunados a un incremento en la actividad del acarreador de potasio, aumentan la concentración de este último dentro de la mitocondria, provocando el hinchamiento (figura 10). El hipertiroidismo mostró similitud con el CAT como agentes inductor de la transición de la permeabilidad.

En las mitocondrias hipertiroideas se incrementa la generación de ROS (Fernández et al., 1985). Esto se debe al aumento en el consumo de oxígeno (tabla 1), debido al incremento del metabolismo (Goglia, 1999). La producción de los radicales libres se realiza cuando la mitocondria consume oxígeno en ausencia de ADP (estado 4 de la respiración). Las mitocondrias hipertiroideas presentaron un incremento mayor en el estado 4 de la respiración que en el estado 3 (tabla 1). El estrés oxidativo generado en las mitocondrias hipertiroideas provocó daño en la membrana interna el cual altera la permeabilidad. Se ha reportado que alteraciones en la cadena respiratoria por UV (Chávez et al., 1998 (a)) y el envejecimiento (Lenaz, 1998), incrementan la producción de ROS y en estas mitocondrias se establece la T.P. Las mitocondrias hipertiroideas presentan disminución de grupos tioles sin oxidar (tabla 3) y aumento en la lipoperoxidación (tabla 2). La oxidación y el entrecruzamiento de los grupos tioles, favorecen el establecimiento de la transición de la permeabilidad (Zazueta et al., 1998). Esto podría deberse a cambios conformacionales del ANT, el cual probablemente forma

el poro de la transición de la permeabilidad (LeQuoc et al.,1988). En las mitocondrias aisladas de ratas hipotiroideas se ha reportado disminución de la producción de radicales libres (Swaroop et al.,1985), disminución de la ANT y cardiolipina (Paradies et al., 1989), además estas mitocondrias no presentan transición de la permeabilidad (Chávez et al., 1998(b)). Esto sugiere que uno de los factores que pueden establecer la T.P. es el daño provocado por los ROS en la membrana y que este daño puede estar relacionado con el ANT.

En el hipertiroidismo existe mayor cantidad de ANT y cardiolipina (Paradies et al.,1996), a la cual se propone que el calcio se une para inducir la formación del poro de la transición (Zazueta et al., 1998). Es claro que las mitocondrias hipertiroideas tienen una mayor cantidad de sitios donde se puede unir el calcio para promover la transición de la permeabilidad, o tienen mayor afinidad por este catión, por lo que se necesita menor cantidad de calcio libre para promover la transición.

La lipoperoxidación que sufren las mitocondrias hipertiroideas provoca daño en la integridad de la membrana interna, modificando su selectividad. El aumento en la velocidad del estado 4 de la respiración, aumenta el pH intramitocondrial favoreciendo la actividad de la fosfolipasa A₂ (Rustenbeck et al.,1996). El aumento de la actividad de esta enzima incrementa la cantidad de ácidos grasos libres, los cuales pueden formar radicales libres. Estos radicales libres pueden reaccionar con otros ácidos grasos incrementando el daño en la membrana. Por lo que estas mitocondrias no pueden mantener al calcio dentro de ellas (tabla 4).

En el estado hipertiroideo existe una disminución de la actividad de la súper oxido dismutasa y de la catalasa, además de la disminución de glutatión reducido

(Venditti et al., 1997). Por lo que las mitocondrias hipertiroideas son más susceptibles al daño generado por el estrés oxidativo.

El incremento de la permeabilidad inducido por el hipertiroidismo requiere de la adición de calcio. El incremento en la permeabilidad, no se presentó en las mitocondrias hipertiroideas a las que no se les adicionó calcio (figura 6). Por lo que es indispensable la presencia de calcio más el estado hipertiroideo para promover la transición de la permeabilidad.

El daño producido por el calcio en la integridad de la membrana interna puede deberse a: I) El ciclo de calcio en la membrana interna. II) Unión a sitios externos o III) Por la unión a sitios específicos del lado interno de la membrana. Chávez y colaboradores (1991), demostraron que la adición de rojo de rutenio no restablecía el potencial de membrana después de la adición de calcio más CAT, por lo que el ciclo del calcio no está involucrado en el mecanismo de inducción de la transición de la permeabilidad. Además reportaron que la depleción de calcio inducida por el A23187 más EGTA restauraba el potencial de membrana. Esto indica que el calcio intramitocondrial es necesario para establecer la transición de la permeabilidad.

El calcio libre dentro de la matriz depende de las tasas de captación y de liberación. Además de la precipitación como fosfato de calcio (Greenawalt et al., 1964) y de la unión a las cargas negativas internas de los fosfolípidos de la membrana (Carafoli, 1987). Esta densidad de cargas negativas está regulada por los cationes que se encuentran en la matriz mitocondrial. El potasio es el catión

monovalente más abundante en la matriz, por lo que este catión probablemente está involucrado en la regulación del calcio libre intramitocondrial.

Las mitocondrias hipertiroideas incubadas en sacarosa no presentaron transición de la permeabilidad, por lo que sugerimos que existe una disminución del calcio libre en las mitocondrias hipertiroideas incubadas en sacarosa. Esta disminución de calcio libre impide que se establezca la transición de la permeabilidad, debido a que no existe exceso de potasio que desplace al calcio de sitios inespecíficos. Sólo cuando se alcanza la concentración necesaria de calcio libre, que se una a sitios específicos, se promueve la transición de la permeabilidad. En mitocondrias depletadas de potasio, la concentración de calcio libre disminuye y no se presenta el efecto inductor de la transición de la permeabilidad por el CAT (Chávez et al., 1991)..

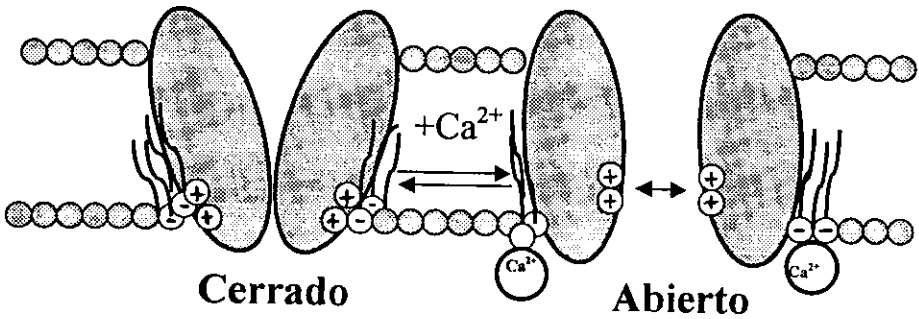
La presencia del potasio es fundamental en la inducción de la transición de la permeabilidad. La adición de potasio a las mitocondrias hipertiroideas incubadas en sacarosa, promueve este fenómeno (figura 3). Esto depende de la concentración de potasio, ya que al ir aumentando la concentración, la inducción de la transición de la permeabilidad es más rápida (figura 4). La adición del potasio, no promovió la transición de la permeabilidad en mitocondrias control a ninguna concentración utilizada en los experimentos.

La transición de la permeabilidad es controlada por la apertura de un poro sensible a los cambios del potencial de membrana (Gunter et al.,1990). Los potenciales bajos favorecen la apertura del poro (Gunter et al.,1990). En las mitocondrias hipertiroideas incubadas en sacarosa, el potencial de membrana se mantiene sin cambios (figura 5). El potencial disminuyó cuando se adicionó al medio potasio. Al

establecerse la transición de la permeabilidad hay un equilibrio de las cargas, por lo que se pierde el ambiente negativo dentro de la mitocondria necesario para mantener la homeostasis del calcio, por lo que es importante la presencia de potasio para el establecimiento de la transición de la permeabilidad.

El exceso de potasio enmascara las cargas negativas de sitios inespecificos donde se puede pegar el calcio. Esto aumenta el calcio libre que puede unirse a sitios especificos donde se promueve la transición de la permeabilidad. Probablemente los sitios donde se une el calcio son los lípidos asociados al translocador, principalmente cardiolipina. Suponemos que al modificarse la conformación estructural del translocador, se forma el poro de la transición de la permeabilidad como lo propone Brustovetsky (1996).

CITOSOL



MATRIZ

Figura N° 11 Modelo propuesto de la conversión del ANT en el poro de la transición de la permeabilidad (Brustovetsky, 1996).

De acuerdo con esto el calcio libre disminuyó por no haber exceso de potasio en las mitocondrias incubadas en sacarosa. La disminución de calcio libre en estas mitocondrias, probablemente se debió a que existen más cargas negativas libres donde se pudo haber unido el calcio. Así el calcio libre se encuentra por debajo de la cantidad necesaria para que se promueva la transición de la permeabilidad.

CONCLUSIÓN

Por los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir: Que el potasio es un factor importante para que se establezca la transición de la permeabilidad en las mitocondrias de hígado de ratas hipertiroideas.

REFERENCIAS

- Akerman K., Wikström M., FEBS Lett. (1976) 68,191-197.
- Akerman K., Biochim Biophys Acta (1978) May 10;502(2):359-66.
- Bernardi P. and Peronilii V., J. of Bioenerg. Biomembr. (1995) Vol. 28 N°2 131-138.
- Brierley G., Baysal K. and Jung D., J. of Bioenerg. Biomembr. (1994) Vol. 26 N°5, 519-526.
- Brustovetsky N. and Klingenberg M., Biochemistry (1996), 35, 8483-8488.
- Castilho R., Kowaltowski A. and Vercesi A., J. Bioenerg. and Biomembr. (1996) Vol 28,N°6, 523529.
- Castilho R., Kowaltowski A. and Vercesi A., Arch. Biochem. Biophys (1998) Jun 1; 354 (1):151-157.
- Carafoli E., Annu.Rev. Biochem. (1987) 56, 395-433.
- Chávez E., Moreno-Sánchez R., Zazueta C., Reyes-Vivas H., and Arteaga D., Biochim. Biophys. Acta. (1991) 461-466.
- Chávez E., Zazueta C., Cuellar A., Reyes-Vivas and García N. Biochem. Mol. Biol. Int. (1998) Vol 46, N°1, September, 207-217 (a).
- Chávez E., Franco M., Reyes-Vivas H., Zazueta C., Ramírez J. And Carrillo R., Biochim. et Biophys. Acta 1407(1998) 243-248 (b).
- Crompton M., Capano M., and Carafoli E., Eur. J. Biochem. (1976) 453-462.
- Fernández V., Barrientos X., Kipreos K., Valenzuela A. And Videla L., Endocrinology (1985) Vol. 117, 496-501.

- Fernández V. and Videla L., *Toxicology Letters* 69 (1993) 205-210.
- Fernández V. and Videla L., *Free Rad.Res. Comms.* (1993) Vol. 18 N°6 329-335.
- Fernández V. and Videla L., *Toxicology Letters* 84 (1996) 149-153.
- Fiskum G., and Cockrell R., *FEBS Lett* (1978) 92, 125-128.
- Garlid K., Martin W. and Beavis A., *J. of Biological C.* (1984) 2062-2065.
- Garlid K., *Biochim. Biophys. Acta* 1275 (1996) 123-126.
- Giuseppe P., Ruggiero F., Dinoi P., Giuseppe P., and Quagliariello E., *Arch. Biochem. Biophys.* (1993) Vol 307, N°1, November 15, 91-95.
- Goglia F., Moreno M., Lanni A., *FEBS Lett.* 452 (1999) 115-120.
- Greenawalt J., Rossi C. and Lehninger A., *J. Cell Biol.* (1964) 23, 21-38.
- Gunter E. and Pfeiffer D., *Am. J. Physiol.* (1990) 258 (Cell Physiol.27): C755-C786.
- Halestrap A., Quilan P., Whipps D. And Armstron A., *Biochem. J.* (1986) 236, 779-787.
- Halestrap A., Davidson., *Biochem. J.* (1990) 268, 153-160.
- Halestrap A., Connern C., Griffiths E. and Kerr P., *Mol. Cell. Biochem.* (1997) 174:167-172.
- Korotkov S., Skulskii I. And Glazunov V., *J. Inorg. Biochem.* 70 (1998), 17-23.
- Kowaltowski A., Naia-da-Silva E., Castilho R. and Vercesi A., *Arch. Biochem. Biophys.* (1998), Vol 359, N°1, November 1,77-81.
- Hunter D. And Haworth R., *Arch. Biochem. Biophys.* (1979) 195, 453-459.
- Lenaz G., *Biochim. et Biophys. Acta* 1366 (1998) 53-67.

- LeQuoc K. and LeQuoc D., Arch. Biochem. Biophys. (1988),265, 466-478.
- Nelson B., Mutvei A. and Joste V., Arch. Biochem. and Biophys. (1984) Vol 228, N°1, January, 41-48.
- Paradies G and Ruggiero F., Arch. Biochem. Biophys. (1989), 269, 595-602.
- Paradies G., Ruggiero F., Petrosillo G and Quagliariello., FEBS Lett (1996),397,260-262.
- Rustenbeck I., Munster W. and Lenzen S., Biochim. et Biophys. Acta 1304 (1996) 129-138.
- Scarpa A. and Azzone G., Eur J. Biochem (1970) Feb; 12 (2):328-335.
- Scarpa A., Brinley F., Triffert T., Dubyak G., (1978) Ann. NY Acad. Sci. 307, 86-112.
- Schönfeld P. and Bohnensack R., FEBS Lett. (1997) 420, 167-170.
- Swaroop A. and Ramasarma T., Biochem. J. (1985) 226, 403-408.
- Valderez G., Fagian M., Parentoni L., Meinicke A. And Vercesi E., Arch. Biochem. Biophys. (1993) Vol.307, N°1, November 15, 1-7.
- Venditti P., Balestrieri M., Di Meo S. and De Leo T., J. of Endocrinology (1997) 155, 151-157.
- Zazueta C., Reyes-Vivas H., Zafra G., Sánchez C., Vera G. And Chávez E., Int. J. Biochem. and Cell Biol. 30 (1998), 517-527.
- Zoratti M., and Szabo I., J. Bioenerg. and Biomembr. (1994) Oct;26 (5):543-553.