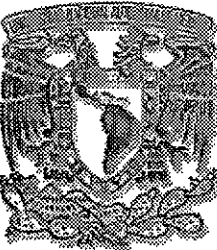


13 00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

INFLUENCIA DE LA HORMONA TIROIDEA SOBRE LAS FUNCIONES DE LA ADENÍN NUCLEÓTIDO TRANSLOCASA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

Q.F.B. NOEMÍ GARCÍA RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDMUNDO CHAVEZ COSSIO

MÉXICO D.F.

2002





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de mayo de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) García Ramírez Noemí, con número de cuenta 99809731, y número de expediente 3991064, con la tesis titulada: "Influencia de la hormona tiroidea sobre las funciones de la adenín nucleótido translocasa.", bajo la dirección del Dr. Edmundo Chávez Cossio.

Presidente:	Dr. Enrique Piña Garza
Vocal:	Dr. Salvador Uribe Carvajal
Secretario:	Dr. Edmundo Chávez Cossio
Suplente:	Dra Ana Cecilia Zazueta Mendizábal
Suplente:	Dr. Rafael Moreno Sánchez

Sin otro particular, quedo de usted

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 3 de junio de 2002

Dra. Tila María Pérez Ortiz  
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

La presente tesis se realizó en el departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez bajo la dirección del Dr. Edmundo Chávez Cossío. Con el apoyo económico de la institución y de los proyectos 34387-N y 36606-N de CONACyT.

A mis padres, que aunque lejos siempre me han apoyado e impulsado  
en todo momento.

A mis hermanos, con los que he aprendido muchas cosas de la vida.

A mis tíos Gabriel, Gela, Carlos y Carmen, quienes siempre me han  
enseñado a luchar con su ejemplo.

A Felipe, de quien he recibido amor y comprensión

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Edmundo Chávez y al Dr. Rafael Moreno Sánchez por permitirme formar parte de su laboratorio

A la Dra. Ana Cecilia Zazueta, por sus siempre oportunas sugerencias.

Al Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, por el apoyo y financiamiento de esta tesis

A mis amigos de siempre Luz María Lara, Laura Figueroa y Victor Camacho (Los cuchitriles)

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Paco, Ricardo, Martha, Marce, David, Norma, Karla, Conchita, Dr. Silveira, Raymundo. Gracias por hacerme mas ameno el trabajo.

A César Avilés, con quien he compartido buenos y malos momentos, que nos han enseñado a ser mejores cada día. Gracias

# CONTENIDO

ABREVIACIONES, 1

RESUMEN, 2

INTRODUCCIÓN, 3

Efecto de la hormona tiroidea a nivel celular y mitocondrial, 3

Adenín nucleótido translocasa, 6

Efecto de la hormona tiroidea sobre la composición lipídica de la membrana mitocondrial, 11

Transición de permeabilidad de la membrana interna mitocondrial (TMP), 14

HIPÓTESIS, 20

OBJETIVOS, 20

MATERIAL Y METODOS, 21

Establecimiento del modelo hipertiroideo e hipotiroideo, 21

Preparación de mitocondrias, 21

Partículas submitocondriales, 22

Recambio de adenín nucleótidos en mitocondrias, 22

Purificación de la adenín nucleótido translocasa, 23

Extracción de lípidos mitocondriales, 24

Formación de liposomas, 24

Reconstitución de la adenín nucleótido translocasa, 24

Recambio de adenín nucleótidos en liposomas, 25

Transición de la permeabilidad en liposomas por detección de un indicador fluorescente, 25

Determinación de fosfolípidos totales, 26

Determinación de cardiolipina, 27

RESULTADOS, 28

Actividad de la adenín nucleótido translocasa en mitocondrias, 28

Calidad de los liposomas, 29

Aislamiento de la adenín nucleótido translocasa, 32

Aislamiento y reconstitución de la ANT de los diferentes tipos de mitocondrias, 35

Cinética de recambio de la ANT en un sistema reconstituido, 36

Efecto de la composición lipídica sobre la cinética de la adenín nucleótido translocasa, 40

Contenido de cardiolipina, 44

Transición de la permeabilidad mitocondrial en liposomas, 45

DISCUSIÓN, 52

CONCLUSIONES, 56

PERSPECTIVAS, 57

REFERENCIAS, 58

## ABREVIACIONES

<b>T3</b>	3,3, 5- Triiodo-L-tironina
<b>T4</b>	L- tiroxina
<b>TSH</b>	Hormona estimulante de la hormona tiroidea
<b>TREs</b>	Elementos de respuesta de la hormona tiroidea
<b>EDTA</b>	Acido etilendiamino tetracético
<b>TRIS</b>	(Tris[hidroximetil]aminometano)
<b>HEPES</b>	(ácido 4-[hidroxietil]-1-piperazinetanosulfónico)
<b>CAT</b>	Carboxiatractilósido
<b>MOPS</b>	Acido-3-N-morfilino propanosulfónico
<b>HTP</b>	Hidroxiapatita
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>HIPER</b>	Hipertiroidismo
<b>HIPO</b>	Hipotiroidismo
<b>C</b>	Eutiroidismo
<b>TPM</b>	Transición de la permeabilidad mitocondrial
<b>KDa</b>	kilodaltones
<b>UCP</b>	Proteína desacoplante
<b>NEM</b>	N-etil maleimida
<b>EMA</b>	Eosin maleimida
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>VDAC</b>	Canal aniónico dependiente de voltaje
<b>FL<sub>C</sub></b>	Fosfolípidos de membranas eutiroides
<b>FL<sub>Hiper</sub></b>	Fosfolípidos de membranas hipertiroideas
<b>FL<sub>Hipo</sub></b>	Fosfolípidos de membranas hipotiroideas
<b>ANT<sub>C</sub></b>	Adenín nucleótido translocasa de mitocondrias eutiroides
<b>ANT<sub>Hiper</sub></b>	Adenín nucleótido translocasa de mitocondrias hipertiroideas
<b>ANT<sub>Hipo</sub></b>	Adenín nucleótido translocasa de mitocondrias hipotiroideas



## SUMMARY

The thyroid hormone (T<sub>3</sub>) regulate protein synthesis. The T<sub>3</sub> in high concentrations enhances the protein expression, for example, the adenine nucleotide translocase (ANT), the opposite occurs in hyperthyroidism. The T<sub>3</sub> also modifies the lipidic composition of the membrane. These modifications promote changes in the permeability transition of the mitochondria (PTM), that are higher in mitochondria from hyperthyroid rats and lower in hypothyroid. In this work we wanted to establish if the variation in the ANT content and the changes of the lipidic composition of the membrane affect the PTM. To accomplish, that we isolated and reconstituted the ANT and equal concentrations in liposomes that were formed from mitochondria lipids from euthyroid, hyperthyroid and hypothyroid rats. The reconstituted activity of ANT were as follows: hyperthyroid>euthyroid>hypothyroid. When we reconstituted different ANT in euthyroid liposomes, the activity of euthyroid ANT, hyperthyroid ANT and hypothyroid ANT was equal, just as occurred when it was reconstituted in hyperthyroid liposomes and hypothyroid liposomes. Comparing this groups of proteoliposomes, we determined that the activity of ANT only changed as a function of the lipidic composition.

However, PTM was measured using the same combinations of liposomes and ANT in the presence of calcium 100  $\mu$ M and different concentrations of myristic acid. An increase of the PTM in hyperthyroid proteoliposomes with respect to the euthyroid proteoliposomes and hypothyroid proteoliposomes was determined. As occurred in the activity of ANT, when measured the PTM in only one type from proteoliposomes and different ANT, the PTM was also equal in all cases, but it was different with combinations of the liposomes. The data show that the PTM changes as a function of the membrane lipidic composition.

## RESUMEN

La hormona tiroidea (T3) regula la síntesis de proteínas. En presencia de altas concentraciones de T3 (hipertiroidismo) la expresión de proteínas aumenta, como es el caso de la adenín nucleótido translocasa (ANT). Lo contrario sucede en el hipotiroidismo. La T3 también modifica la composición lipídica de la membrana. El conjunto de estas modificaciones promueven cambios en la transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM), siendo más aumentada en mitocondrias de ratas hipertiroides y disminuye en hipotiroideas. En este estudio tratamos de establecer si la variación en el contenido de ANT afectan la TPM, o bien es la composición lipídica la responsable de estos cambios. Por lo tanto se aisló la ANT y se reconstituyó, la misma cantidad, en liposomas formados con lípidos de mitocondrias de ratas eutiroideas, hipertiroides e hipotiroideas. La actividad reconstituida de la ANT siguió la siguiente secuencia: hipertiroides>eutiroideas>hipotiroideas. Al reconstituir las diferentes ANT en liposomas formados con FL<sub>C</sub>, la actividad de la ANT<sub>C</sub>, ANT<sub>Hiper</sub> y ANT<sub>Hipo</sub> fue la misma, lo mismo ocurrió cuando se reconstituyeron en liposomas formados con FL<sub>Hiper</sub> y liposomas formados con FL<sub>Hipo</sub>. Al comparar estos grupos de proteoliposomas, encontramos que la actividad de la ANT cambia dependiendo del ambiente lipídico en el cual se encuentre.

Por otro lado, se midió la TPM usando las mismas combinaciones de liposomas y ANT en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de calcio y diferentes concentraciones de ácido mirístico. Se observó un aumento significativo de la TPM en proteoliposomas formados con FL<sub>Hiper</sub>-ANT<sub>Hiper</sub> con respecto a los proteoliposomas formados con FL<sub>C</sub>-ANT<sub>C</sub> y proteoliposomas formados con FL<sub>Hipo</sub>-ANT<sub>Hipo</sub>. Al igual que en la actividad de la ANT, al medir la TPM en un solo tipo de liposomas y diferentes ANT, la TPM fue la misma en los tres casos, pero diferentes cuando se cambiaron los fosfolípidos. Los datos sugieren que la TPM varía dependiendo del ambiente lipídico en el cual se encuentre.

# INTRODUCCIÓN

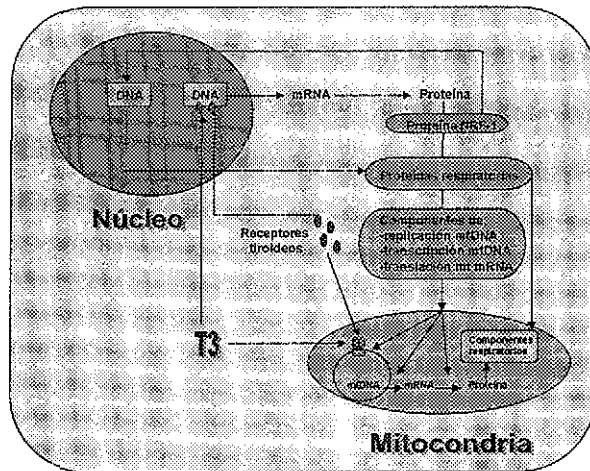
## EFFECTO DE LA HORMONA TIROIDEA A NIVEL CELULAR Y MITOCONDRIAL

En organismos superiores el consumo de la energía producida por el metabolismo es regulado parcialmente por la hormona tiroidea. Esta hormona se encuentra en dos formas, como L-tiroxina (T4) y L-triiodotironina (T3); ambas se sintetizan a partir de yodo y tirosina proveniente de proteínas ingeridas en la dieta. Normalmente la producción de la hormona es regulada por un mecanismo que involucra a la hipófisis anterior y la glándula tiroides. La hipófisis anterior produce la hormona estimulante de la tiroides (TSH) que a su vez estimula a esta glándula produciendo la liberación de T4 y T3 que pasan directamente al torrente sanguíneo. La T4 y T3 a su vez regulan la producción de TSH. La hormona T3 afecta la expresión de varios genes mediante un receptor nuclear de la T3 (TR), el cual se encuentra asociado al genoma uniendo a la hormona con muy alta afinidad y especificidad. Estos receptores TR son factores transcripcionales que modulan la transcripción por su unión a sitios específicos del DNA conocidos como elementos de respuesta de la hormona tiroidea (TREs). En ausencia de T3, el receptor nuclear tiene la función de actuar como receptor transcripcional intrínseco [Goglia y cols 1999, Pillar y Seitz 1997]

La regulación de la transcripción por la T3 está dada por genes que codifican proteínas mitocondriales o componentes que activan o inhiben el material genómico mitocondrial. En mamíferos, existen aproximadamente 100

genes necesarios para la biogénesis de los componentes mitocondriales, codificados en el núcleo y solo hay 13 componentes genéticos codificados en mitocondrias. La T3 regula la velocidad de transcripción del RNA mensajero para la síntesis de proteínas mitocondriales. Los RNAm se incrementan de 2 a 8 veces después de 1-3 días de tratamiento con T3. Existen dos mecanismos alternos para explicar la regulación de la transcripción, una es a través de la activación de la expresión de un factor transcripcional mitocondrial (mtRNA) o directamente a través de receptores mitocondriales específicos de la T3 [Goglia y cols 1999, Pillar y Seitz 1997]. Esta última se lleva a cabo por la unión directa de la T3 a receptores específicos mitocondriales, afectando de esta manera la transcripción mitocondrial, que junto con la T3 que se une a receptores nucleares, regulan la biogénesis mitocondrial. Se han identificado dos proteínas mitocondriales que unen a la T3, una de peso molecular de 43 kDa localizada en la matriz mitocondrial y otra de 28 kDa localizada en la membrana interna mitocondrial (**Esquema 1**) [Goglia y cols 1999]

Los cambios en la expresión de genes para proteínas respiratorias mitocondriales modifican la eficiencia de acoplamiento entre la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa. Además una alteración en la composición lipídica de la membrana interna mitocondrial, por influencia de la T3, modifica su permeabilidad [Pillar y Seitz 1997, Nelson y cols 1984].



**Esquema 1.** Regulación de la hormona tiroidea a nivel nuclear y mitocondrial. Los componentes respiratorios son regulados por ambos genomas. Efecto de la T3 sobre la expresión de genes directa o indirectamente. La figura se tomó de Goglia y cols 1999

La respiración se ve más acelerada en mitocondrias de ratas hipertiroideas y disminuida en mitocondrias de ratas hipotiroideas. Además en mitocondrias de músculo esquelético y grasa café también muestran un desacoplamiento que se atribuye a la proteína desacoplante tipo dos y tres (UCP2 y UCP3). Sin embargo, en hepatocitos el desacoplamiento se atribuye al transportador de adenín nucleótidos (ANT) el cual realiza la función de la UCP2 actuando como un desacoplante [Bobyleva y cols 1998, Goglia y cols 1999].

Se ha encontrado, midiendo los niveles de RNA mensajeros, que muchas de las proteínas codificadas en mitocondria y núcleo aumentan su contenido en células hipertiroideas (Tabla 1), es decir cuando hay un aumento en el contenido

de T3, y disminuye en células hipotiroideas [Schlame y Hostetler 1997] En el caso de la citocromo oxidasa, el aumento en su actividad, por efecto de la T3, se debe a un aumento en el contenido de la enzima y a una modificación en el contenido de cardiolipina [Paradies, 1994]. Por otro lado existen algunos reportes en los cuales se ha encontrado que la hormona tiroidea aumenta la actividad de otras proteínas tales como el acarreador de tricarboxilatos [Paradies y Ruggiero 1990a], el acarreador de fosfatos [Paradies y Ruggiero 1990b], cardiolipina sintetasa [Schlam y cols 1997] y oxido nítrico sintasa [Fernández y cols 1997]; tal efecto se ha atribuido a un cambio en la composición lipídica de la membrana.

PROTEÍNA	VARIACIÓN (# veces)	REFERENCIA
Adenín nucleótido translocasa	5-10 (12-48h)	Pillar y cols 1997
Citocromo c	5-10 (12h)	Scarpulla y cols 1986
Citocromo oxidasa	2	Paradies y cols 1993
FAD-glicerol-3-PDH	10-15 (4-6h)	Müller y cols 1994
Mt TFA	2	Garstka y cols 1994
βF1-ATPasa	2-3 (1h)	Izquierdo y cols 1995

Tabla 1. Proteínas mitocondriales modificadas por la acción de la hormona tiroidea

## ADENIN NUCLEOTIDO TRANSLOCASA

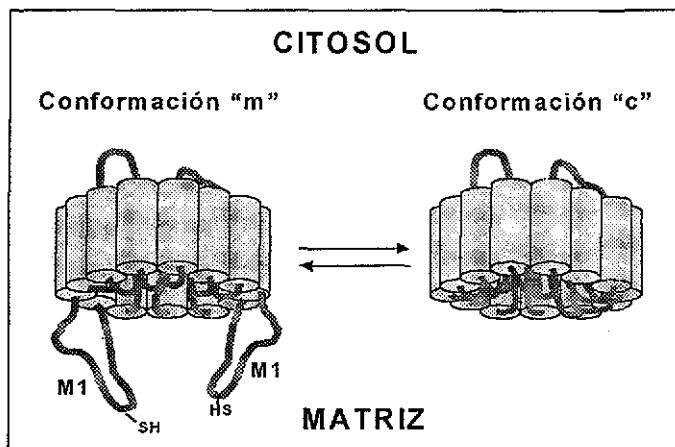
Esta proteína es un dímero cuyos monómeros pesan 30 kDa, determinado por ultracentrifugación y por análisis de entrecruzamiento de proteínas mitocondriales [Hackenberg y Klingenberg 1980] En rata existen dos isoformas de la ANT, las cuales son tejido específicas, la isoforma ANT1 que predomina principalmente en músculo esquelético, corazón y cerebro en un intervalo de 58-

81 % del total de la transcripción de la ANT, y la isoforma ANT2 que predomina en tejidos como riñón e hígado. La influencia de la hormona tiroidea sobre la expresión de la ANT juega un papel muy importante en la regulación del metabolismo. La ANT2 se ve afectada por la T3 aumentando su transcripción; al contrario, Döner y cols (1999) demostraron que la transcripción de la ANT1, no se afecta por la hormona, aunque otros autores Portman y cols (2000) demostraron que la transcripción de la ANT1 sí se modifica por la T3. Al parecer la regulación de la traducción depende del control respiratorio por lo que maduración de la ANT1 no es completada, haciéndose menos evidente la expresión de la ANT1. Schonfeld y cols. (1997) encontraron que en mitocondrias de hígado de ratas hipotiroideas los niveles de ANT disminuyen de 60 a 40 pmol/mg de proteína. En el caso de mitocondrias de corazón de ratas hipertiroideas los niveles de ANT aumentan de 232 a 299 pmol/mg de proteína. En estudios anteriores se demostró que el contenido de ANT en mitocondrias de corazón es del 14 % del total de las proteínas mitocondriales, más alto que en mitocondrias de riñón e hígado en las cuales existe un 6% y 3 % del total de la proteína mitocondrial [Dörner y cols 1999].

Por otro lado Klingenberg y cols (1994) demostraron que la ANT tiene seis hélices transmembranales, dentro de las cuales se encuentran localizados residuos de arginina, que son esenciales para la actividad de la proteína. Existen también residuos de lisina (Lis<sup>179</sup> y Lis<sup>182</sup>) que al ser mutados hacen que la ANT pierda su actividad. Majima y cols (1994), por medio de la interacción de la ANT con compuestos como la NEM (N-etilmaleimida) y la EMA (Eosin-5-maleimida), encontraron que la ANT tiene cuatro cisteínas (Cis<sup>56</sup>, Cis<sup>128</sup>, Cis<sup>159</sup> y Cis<sup>256</sup>) que

forman parte de las asas del acarreador localizadas del lado de la matriz mitocondrial. La  $\text{Cis}^{159}$  es un residuo que también le confiere actividad de recambio a la ANT.

La ANT tiene dos estados conformacionales, el "c" y el "m". La fijación del carboxiatractilósido promueve la conformación "c" en tanto que la unión del ácido bongcréquico estabiliza la conformación "m". La transición entre estos dos estados depende, también, del ADP o ATP. Los nucleótidos se unen del lado citosólico en un estado conformacional "c" y del lado de la matriz en un estado conformacional "m" [Majima y cols 1994]. Estos mismos autores, por entrecruzamiento con cobre-orto-fenantrolina, demostraron que la translocación de adenín nucleótidos se lleva a cabo por cambios conformacionales de la ANT de una conformación "c" a una "m". En la conformación "c" las asas que tienen a las cisteínas se encuentran del lado citosólico, entre cada monómero de la ANT y en la conformación "m" las cisteínas se localizan del lado de la matriz (**Esquema 2**) [Majima y cols 1995].



**Esquema 2** Estados conformacionales de la adenín nucleótido translocasa. Tomado de Majima y cols 1995.



Las propiedades cinéticas de la ANT indican que la estequiometría de recambio de adenín nucleótidos es de 1:1. La cinética de recambio presenta un comportamiento tipo Michaelis-Menten, en donde la  $K_m$  obtenida para el ADP y el ATP externos depende del estado de energía en la cual se encuentre la mitocondria; el valor de la  $K_m$  varía de entre 1-10  $\mu\text{M}$  para el ADP y de 1-150  $\mu\text{M}$  para el ATP. La energización incrementa la  $K_m$  para el ATP externo y disminuye la  $K_m$  para el ADP externo. Se puede considerar que la ANT existe en dos estados, uno de alta energía y otro de baja energía, diferenciándose por la afinidad hacia el ATP o ADP. En mitocondrias de ratas hipotiroideas, la cinética de recambio se modifica disminuyendo su  $V_{\text{max}}$  de entre un 25 a 35 % y aumentando su  $K_m$  hasta en un 75 %, tal efecto se atribuye a una modificación en la composición lipídica [Mak y cols 1983]. El recambio  $\text{ADP}^3/\text{ATP}^4$  es electrogénico debido a que el intercambio de  $\text{ATP}^4$  externo por  $\text{ADP}^3$  interno es compensado por un movimiento de protones. La compensación de cargas puede ocurrir a través de la salida de fosfato [Vignais, 1976]. Krämer y Klingenberg (1980) demostraron que el recambio de adenín nucleótidos, en un sistema reconstituido, la direccionalidad del recambio por ADP-ATP es regulado por el potencial transmembranal.

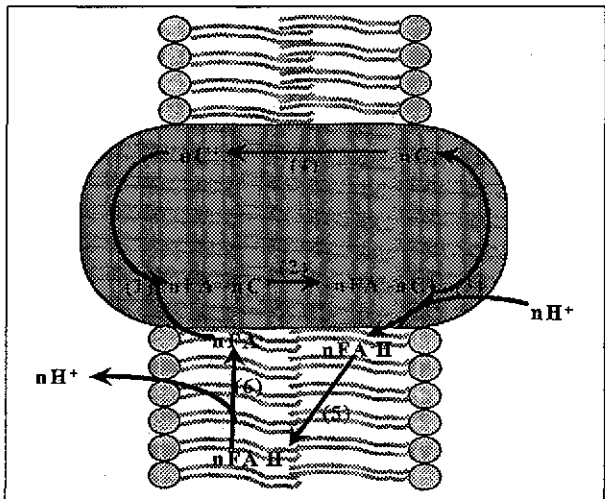
Los inhibidores específicos de la ANT son el atractilósido, el carboxiatractilósido y el ácido bongcréquico. El atractilósido y el carboxiatractilósido son glucósidos, los cuales tienen grupos sulfato y un residuo de ácido isovalérico, por lo cual no atraviesan la membrana interna mitocondrial y se unen del lado citosólico de la ANT [Vignais, 1976]. En el caso del ácido

bongocréuico, éste sí atraviesa la membrana mitocondrial, uniéndose del lado de la matriz [Duyckaerts y cols 1980]. El carboxiatractilósido difiere del atractilósido por un grupo carboxilo. El atractilósido es un inhibidor competitivo fuertemente pegado del transporte de adenín nucleótidos, el carboxiatractilósido es un inhibidor no competitivo fuertemente pegado y el ácido bongocréuico es un inhibidor incompetitivo fuertemente pegado. La Kd del carboxiatractilósido por la ANT es de 10 nM en una proporción 1:1, para el atractilósido y el ácido bongocréuico la Kd es de 20 nM.

Recientemente se ha establecido el efecto que tiene la composición lipídica de la membrana sobre la actividad de la ANT en un sistema reconstituido. Se demostró que la actividad de la ANT depende de la presencia de fosfatidiletanolamina y cardiolipina en una proporción de 92:8. Las cargas negativas de los fosfolípidos, como la cardiolipina estimulan la actividad de la ANT al neutralizar las cargas de los aminoácidos con carga positiva (Lis<sup>179</sup>, Lis<sup>182</sup>); los cationes divalentes también afectan la velocidad de recambio [Beyer y Nuscher 1996]. En base a esto existen otros reportes en los cuales se describe la interacción que tiene la cardiolipina con cationes divalentes como el calcio. Se estableció que al interactuar el calcio con la ANT se forma un canal, fijando a la proteína en su conformación c en presencia de CAT [Brustovetsky y Klingenberg 1996]

Por otro lado, se sabe que la ANT interviene en el efecto desacoplante de los ácidos grasos Schonfeld y cols (1997) demostraron que la ANT está involucrada en el desacoplamiento por ácidos grasos estimulando la respiración. Este efecto puede ser alterado por un estado tiroideo, aumentando la expresión

de la ANT. El mecanismo del efecto desacoplante de los ácidos grasos es a través de la ANT. Se lleva a cabo por la unión del ácido graso a un ligando catiónico del acarreador (lisina y arginina), translocando el ácido graso de un lado a otro protonando a los ácidos grasos, facilitando de esta manera el paso a través de la membrana, dando como consecuencia la translocación de protones del medio al espacio intramitocondrial (Esquema 3) [Skulachev, 1998].



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

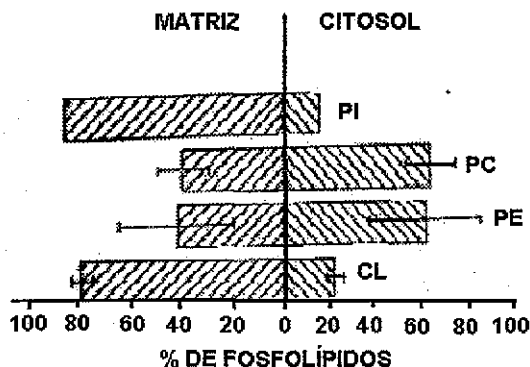
Esquema 3. Transporte de ácidos grasos a través de la adenín nucleótido translocasa. El ligando catiónico (lisina o arginina) une al ácido graso, se transloca y el ácido graso une protones permitiendo el paso a través de la membrana, liberando protones del otro lado de la membrana. Tomado de Skulachev, 1998

**EFFECTO DE LA HORMONA TIROIDEA SOBRE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL**

La cardiolipina es un fosfolípido con dos grupos fosfato unidos por un glicerol. Se sintetiza a partir de ácido fosfatídico y fosfatidilglicerol. Por sus características moleculares, la cardiolipina puede formar estructuras lamelares o hexagonales invertidas. La fase hexagonal se favorece en presencia de cationes

divalentes, pH bajo y una fuerza iónica alta. La fase lamelar es estabilizada por proteínas. Un incremento en el número de carbonos de las cadenas de ácidos grasos insaturados incrementan la estabilidad hexagonal de la cardiolipina [Erand, 1998].

En mitocondrias la cardiolipina es uno de los fosfolípidos más abundantes puesto que representa del 10-20 % de los fosfolípidos totales. Del 75 al 90 % de este fosfolípido se encuentra distribuido en la membrana interna mitocondrial, del lado de la matriz (**Esquema 4**). La fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina son otros de los fosfolípidos más abundantes en mitocondria, ocupando el 80 % del total de los fosfolípidos. Los fosfolípidos que se encuentran en menor proporción son el fosfatidilinositol y la fosfatidilserina representando entre 1-9 % de los fosfolípidos totales. En células de mamífero el 50 % de los ácidos grasos son insaturados (ácido linoleico y ácido araquidónico), la cardiolipina por su parte tiene un alto contenido de ácidos grasos insaturados (90%) entre los que se encuentra principalmente el ácido linoleico (59 %) [Daum, 1985].



**Esquema 4.** Distribución asimétrica de los fosfolípidos en la membrana interna mitocondrial de células de mamífero. La distribución entre la matriz y el lado citosólico esta expresado en %. Tomado de Daum, 1985

La cardiolipina tiene la propiedad de interactuar con un gran número de proteínas ( $\beta_2$ -glicoproteína I, proteína cinasa, dnaA, histonas, DNA polimerasa, RNA polimerasa, topoisomerasa I y ANT, entre otras) interviniendo en los procesos funcionales y estructurales de las proteínas.

En 1985 Beyer y Klingenberg encontraron que la ANT tiene 6 cardiolipinas fuertemente unidas, las cuales no pueden ser intercambiadas por cardiolipina añadida. En corazón de bovino, cuatro de estas seis cardiolipinas son tetralinoleil-cardiolipina y dos son trilinoleil-monolinolenil-cardiolipina [Schame y cols 1991]. El tratamiento con fosfolipasa  $A_2$  hace que cambie el estado conformacional de la ANT, esto significa que la cardiolipina es necesaria para estabilizar su conformación. Otros estudios han demostrado que la cardiolipina se une con alta afinidad a proteínas debido a las cargas negativas proporcionadas por los grupos fosfato [Schlame y cols 2000].

En el caso de la citocromo oxidasa, se han encontrado dos moléculas de cardiolipina por monómero de esta enzima. Estas moléculas de cardiolipina pueden ser intercambiadas por 2-acetil-cardiolipina y monolisocardiolipina sin alterar la actividad de la enzima [Robinson, 1993]. De lo anterior se deduce que la interacción de la citocromo oxidasa-cardiolipina es débil, a diferencia de lo que sucede con la ANT. En la ANT el orden de interacción es: cardiolipina = monolisocardiolipina > acilcardiolipina > dimetilcardiolipina. Otros complejos como los de la fosforilación oxidativa, Complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa), el Complejo III (ubihidroquinona:citocromo c oxidoreductasa) y el Complejo V (ATP sintetasa) también requieren de cardiolipina para su actividad.

Otras proteínas que pueden ser activadas por cardiolipina son el citocromo P450<sub>SCC</sub>, el acarreador de carnitina y la cardiolipina sintetasa. En el caso de proteínas solubles, la cardiolipina no sólo regula su actividad, sino que también provoca cambios en la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas. La creatín cinasa que es una proteína soluble, se une a la cardiolipina probablemente por el dominio N-terminal [Schlame y cols 2000, Hoch, 1992].

Dependiendo del estado tiroideo, las mitocondrias aumentan o disminuyen la actividad de la cardiolipina sintetasa, llevando con ello a un cambio en el contenido de cardiolipina en la membrana interna mitocondrial [Schlame y cols 2000]. Por lo tanto, la actividad de las enzimas asociadas a la cardiolipina cambia, ya sea disminuyendo su actividad en el caso de mitocondrias hipotiroideas o aumentando en mitocondrias hipertiroideas [Paradies y cols 1990-1997]. También se ha encontrado que el grado de insaturación de los ácidos grasos se ve alterado por el efecto de la hormona tiroidea, aumentando la insaturación en el hipertiroidismo y disminuyendo en el hipotiroidismo [Guerrero y cols 1999]. El contenido de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina también se ve aumentado en el hipertiroidismo [Guerreo y cols 1999; Vasdev y cols 1977]

## **TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL (TPM)**

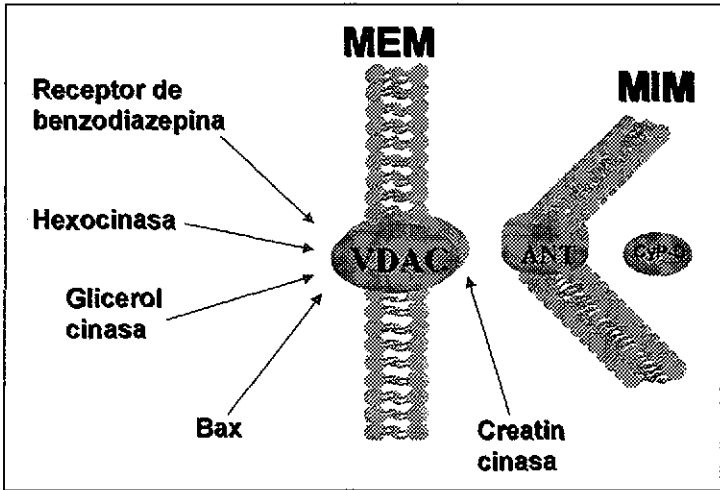
La TPM es un proceso dependiente de altas concentraciones de calcio. El aumento en la permeabilidad está asociada a la formación de un poro que tiene un diámetro aproximado de 2-3 nm [Bernardi, 1996]. La apertura del canal causa el desacoplamiento mitocondrial y permite la salida de iones y pequeñas

moléculas, incluyendo el calcio de la matriz mitocondrial. Estos componentes se intercambian con componentes del medio de incubación. La apertura del canal es totalmente revertida cuando el calcio es removido. La TPM puede ser inhibida en presencia de Ciclosporina A (CsA), por lo que se le llama también poro de CsA [Zoratti y Szabo 1995].

Los componentes de la TPM no se conocen con certeza, sin embargo se han propuesto dos hipótesis para explicar la formación del poro. Una de ellas establece que el poro se puede formar a través de la membrana interna mitocondrial por acción de la fosfolipasa  $A_2$ , dando como resultado una permeabilidad inespecífica. Otra de las hipótesis propone que el poro está formado por una serie de proteínas dentro de las cuales se encuentra una porina de la membrana externa, llamada canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) [Zoratti y Szabo 1995], la adenín nucleótido translocasa de la membrana interna [Brustovetsky y Klingenberg 1996] y una proteína de bajo peso molecular llamada ciclofilina D, que se encuentra en la matriz mitocondrial [Woodfield y cols 1998]. Algunos autores también incluyen a la hexocinasa dentro de este complejo (**Esquema 5**) [Crompton, 1999]. Datos recientes indican que la ANT forma parte de los componentes de la TPM, debido a que la unión del ADP y ácido bongcréuico a la ANT, del lado de la matriz mitocondrial (estado m) inhiben la transición de la permeabilidad. Por el contrario, el CAT, atractilósido, el piridoxal-5-fosfato y la palmitoil-CoA estabilizan a la ANT del lado citosólico (estado c), promoviendo la formación de un canal entre las dos subunidades de la ANT. En un sistema reconstituido Rück y cols (1998) demostraron que la ANT adopta dos conformaciones, las cuales permiten que la ANT tenga dos funciones, una cuando

actúa como un acarreador de ADP/ATP y otra cuando se convierte en un canal inespecífico que lleva a la TPM.

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

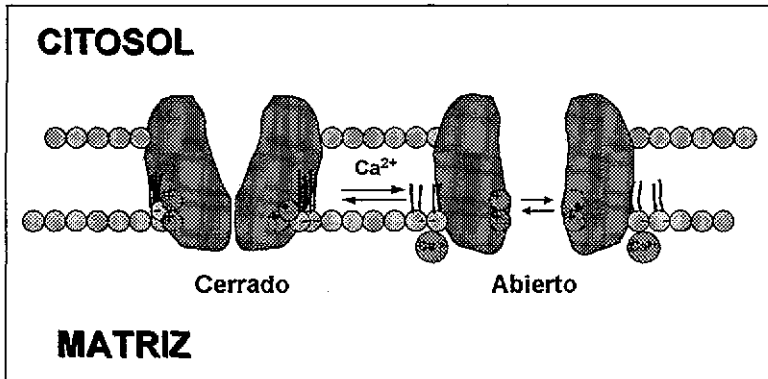


**Esquema 5.** Componentes del poro de transición de la permeabilidad. 1) Canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), 2) Adenín nucleótido translocasa (ANT), 3) Ciclofilina D (CyP-D). Tomado de Crompton, 1999

El calcio, que juega un papel muy importante en la TPM, podría estar unido a las moléculas de cardiolipina fuertemente unidas a la ANT [Beyer y Klingenberg, 1985]. Esta posible unión del calcio interrumpe la interacción de las cargas negativas de la cardiolipina y las cargas positivas de la ANT localizadas del lado de la matriz mitocondrial. El mecanismo que se ha propuesto para inducir la TPM es: a altas concentraciones de calcio, éste se une a los grupos fosfato de la cardiolipina, liberando las cargas positivas de la ANT las cuales se repelen



formando un canal entre las dos subunidades (Esquema 6) [Brustovetsky y Klingenberg, 1996].



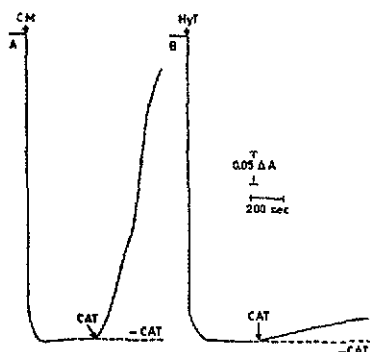
Esquema 6. Efecto del calcio sobre la adenín nucleótido translocasa y su relación con la cardiolipina. Tomado de Brustovetsky y Klingenberg, 1996

La CsA inhibe la TPM por un mecanismo que involucra a grupos tioles. A este respecto Novgorodov y cols (1990) demostraron, en un sistema reconstituido, que el efecto de la CsA es revertido cuando se utilizan modificadores de grupos tioles de la ANT como inductores. Dentro de estos se encuentran el óxido de fenilarsina, que es un entrecruzador de grupos  $-\text{SH}$  localizados en la parte hidrofílica de la membrana, tal efecto es inhibido por NEM. Zazueta y cols han encontrado que el  $\text{Cu}^{2+}$ -orto-fenantrolina [Zazueta y cols 1998] y el cadmio [Zazueta y cols 2000], también promueven la TPM, uno como entrecruzador y el otro como modificador de grupos sulfhidrilo de la ANT.

Algunos autores han descrito que los ácidos grasos (ácido palmítico, mirístico y oleico) también promueven la TPM, gracias a sus propiedades protonofóricas que facilitan el movimiento de protones a través de la membrana. En este proceso interviene la translocasa, además de otros acarreadores como el de aspartato-glutamato. El efecto de los ácidos grasos requiere de la presencia de calcio que contribuye a la apertura del poro. Por lo que se ha propuesto que la acción de los ácidos grasos no solo se debe a la acción protonofórica, sino que también podría deberse a la estabilización de la ANT en su conformación "c" promoviendo la TPM [Schönfeld y cols 1997, Wieckowski y cols 1998]. También se ha analizado el efecto de los ácidos grasos en un sistema reconstituído y se encontró que los ácidos grasos promueven la TPM en ausencia de potencial eléctrico [Wieckowski y cols 2000]

La hormona tiroidea puede inducir la TPM. Malkevitch y cols (1997) demostraron, en mitocondrias, que la tiroxina (T4) induce hinchamiento mitocondrial y disminuye el potencial transmembranal en presencia de altas concentraciones de calcio. Tal efecto es revertido por la adición de EGTA o de CsA. Se propone que el mecanismo involucra a un incremento en la producción de ácidos grasos, los cuales son inductores de la TPM (como ya se mencionó anteriormente). Es decir las mitocondrias de ratas hipertiroideas son más sensibles a sufrir la TPM en presencia de altas concentraciones de calcio. Chávez y cols (1998) demostraron que las mitocondrias de ratas hipotiroideas son resistentes a la TPM inducida por carboxiatractilósido (que fija a la ANT del lado citosólico) (Figura A). La resistencia puede ser atribuida a una disminución en el contenido de ANT o a una modificación en la composición lipídica de la

membrana. El cambio en la composición lipídica puede llevar a una modificación de la fluidez de la membrana, que influye en el establecimiento de la TPM [Ricchelli y cols 1999]. Por otro lado, Schönfeld y cols (1997) demostraron que en mitocondrias de ratas hipotiroideas hay una disminución en el contenido de ANT, y en consecuencia hay resistencia a la acción de los ácidos grasos, es decir el efecto de los ácidos grasos depende del contenido de ANT presente en estas mitocondrias.



**Figura A.** Resistencia de las mitocondrias hipotiroideas a la transición de la permeabilidad mitocondrial. En A se observan las mitocondrias controles (CM), que liberan el calcio en presencia de carboxiatractilósido y en B mitocondrias hipotiroideas (HyT), que retienen el calcio en presencia de carboxiatractilósido. Tomado de Chávez et. al. 1998

Los antecedentes señalados nos motivaron a estudiar el efecto que tiene el hipertiroidismo y el hipotiroidismo en la actividad de la ANT y su transformación en un canal inespecífico que lleva al establecimiento de la TPM. El efecto puede estar dado por cambios en la composición lipídica, involucrando específicamente a la cardiolipina o por modificación en el contenido de la ANT.

## **HIPÓTESIS:**

La hormona tiroidea modula el contenido de ANT y la composición lipídica. Por lo tanto la hormona tiroidea debe modificar la transición de la permeabilidad mitocondrial en mamífero

## **OBJETIVOS:**

- a. Inducir la transformación de la adenín nucleótido translocasa en un poro que lleva al establecimiento de la transición de la permeabilidad mitocondrial
- b. Determinar la influencia que pueda tener la composición lipídica de la membrana interna mitocondrial en la transformación de la ANT en un poro inespecífico

## **HIPÓTESIS:**

La hormona tiroidea modula el contenido de ANT y la composición lipídica. Por lo tanto la hormona tiroidea debe modificar la transición de la permeabilidad mitocondrial en mamífero

## **OBJETIVOS:**

- a. Inducir la transformación de la adenín nucleótido translocasa en un poro que lleva al establecimiento de la transición de la permeabilidad mitocondrial
- b. Determinar la influencia que pueda tener la composición lipídica de la membrana interna mitocondrial en la transformación de la ANT en un poro inespecífico

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para cumplir los objetivos planteados se siguió la siguiente metodología:

a. *ESTABLECIMIENTO DEL MODELO HIPERTIROIDEO E HIPOTIROIDEO.*

El hipertiroidismo fue establecido por la inyección subcutánea diaria, durante 5 días de triiodotironina 2 mg/Kg de peso. El hipotiroidismo fue causado agregando en el agua de bebida 0.05% de 6-n-propil-2-tiouracilo durante 3 ó 4 semanas [Paradies y cols 1993] y en algunas ocasiones por remoción quirúrgica de la glándula tiroides. La remoción se realizó con la rata anestesiada, en seguida se visualizó la glándula paratiroides en un microscopio estereoscopio removiendo la glándula tiroides y la paratiroides, la glándula paratiroides fue reimplantada en el contorno del cuello del músculo, tres meses después las ratas fueron sacrificadas [Chávez y cols 1998].

b. *PREPARACIÓN DE MITOCONDRIAS.* Las mitocondrias se prepararon a partir de hígado de ratas eutiroideas, hipertiroides e hipotiroideas. Se extraen los hígados y se fraccionan en un medio que contiene sacarosa 0.25 M, Tris 10 mM pH 7.3 con o sin 1 mM EDTA efectuando varios lavados durante este proceso, en seguida se homogeneizó el tejido utilizando un homogeneizador previamente enfriado. El homogenizado se pasó a tubos fríos y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de una gasa, para eliminar el exceso de grasa, el filtrado se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min, de esta centrifugación se recuperó la pastilla y se resuspendió en el mismo medio,

libre de EDTA, más 0.1 % de albúmina bovina. Se incubó durante 10 min y se centrifugó nuevamente a 10 000 rpm por 10 minutos. Por último se resuspendió la pastilla en 1 ml de medio libre de EDTA y se determinó la proteína por el método de Lowry [Lowry y cols 1951].

- c. *PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES*. Se obtuvieron a partir de mitocondrias (aproximadamente 500 mg de proteína) llevándolas a 200 ml con un medio que contenía sacarosa 0.25 M y Tris 10 mM pH 7.3, se ajustó el pH a 8.6 con Tris y se sometió a radiaciones ultrasónicas durante 8 ciclos de 60 segundos cada uno, después del tratamiento se obtuvieron pequeñas vesículas, las cuales se recuperaron centrifugando a 45 000 rpm durante 40 min. Finalmente se recuperó la pastilla y se resuspendió en sacarosa 0.25 M y Tris 10 mM, pH 7.3 [Lee y Ernster, 1965]. Se determinó la proteína por el método de Lowry.
- d. *RECAMBIO DE ADENÍN NUCLEÓTIDOS EN MITOCONDRIAS* Se llevó a cabo en un medio con KCl 125 mM, HEPES 10 mM, pH 7.3. A 3 ml de medio se le agregó una suspensión mitocondrial equivalente a 2 mg de proteína y diferentes concentraciones de [<sup>3</sup>H]ADP (2, 5, 10, 30 y 60 μM) con una actividad específica de 1500 cpm/nmol, a 4 °C por 30 segundos; el recambio se detuvo con 30 nmol de carboxiatractilósido (CAT), se tomó una alícuota de 200 μl y se filtró en membranas de nitrocelulosa (Millipore), de 0.45 μm de diámetro de poro, seguido de lavados con KCl 0.1 M. Las membranas se pasaron a viales a los cuales se agregaron 5 ml de líquido de centelleo (mezcla de 2,5-Difeniloxazol, p-bis[o-metilestearil] y tolueno) para determinar la radioactividad en un contador de centelleo

- e. *PURIFICACIÓN DE LA ADENÍN NUCLEÓTIDO TRANSLOCASA*. La ANT se purificó de acuerdo con Rojo y Walliman (1994) Se solubilizó 10 mg de proteína (partículas submitocondriales) con 2 ml de una solución que contiene Tritón X-100 4 %, NaCl 0.5 M, MOPS 10 mM a pH 7.2 y 4 ml de sacarosa 0.25 M, Tris 10 mM, pH 7.3. Se mantuvieron en agitación a 4°C durante 30 min, se centrifugó a 45 000 rpm por 35 min, se recuperó el sobrenadante y se pasó a una columna de hidroxapatita (HTP) a una concentración de 2 mg de proteína/ml de HTP, previamente equilibrada con Tritón X-100 0.5 %, NaCl 0.5 M, MOPS 10 mM, pH 7.2. La proteína se separó por batch, agitando durante 45 min la mezcla de HTP/proteína separando la resina de la proteína por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante, y se aplicó a una segunda columna de azul de sefarosa (3 ml/mg proteína) previamente equilibrada con la misma solución de la columna anterior. Se eluyó con Tritón X-100 0.5 %, NaCl 0.5 M, MOPS 10 mM, pH 7.2 (5 ml), se pasó un gradiente de NaCl 0.15-3 M (el cual contiene HEPES 10 mM, EDTA 1 mM), se colectaron fracciones de 1 ml, finalmente se eluyó con 0.15 M de NaCl-0.1 % de SDS. Se determinó la proteína a cada una de las fracciones y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% para observar el grado de pureza de la proteína, al mismo tiempo se reconstituyó en liposomas y se les midió la actividad de recambio.
- f. *EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS MITOCONDRIALES*. La extracción de los lípidos se realizó a partir de partículas submitocondriales (150 mg) de mitocondrias de ratas eutiroideas, hipertiroideas e hipotiroideas. Se agregó



20 ml de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) y 0.02 % de Butilato de hidroxitolueno, como antioxidante, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 3 000 rpm durante 5 min, después de la centrifugación se separó la fracción clorofórmica y se realizó una segunda extracción. A la fase clorofórmica se le agregó un volumen igual de agua bidestilada, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min, para separar la parte clorofórmica, la cual se evaporó a 30 °C en presencia de N<sub>2</sub>. Una vez secos se resuspendieron en un volumen conocido de cloroformo y se almacenaron a -70 °C [Cartwright, 1993]

g. *FORMACIÓN DE LIPOSOMAS*. Se tomaron 40 mg de la extracción lipídica, se evaporó el cloroformo y se resuspendieron en 2 ml de éter dietílico. Aparte, se preparó una solución que contenía 10 mM de KCl, 50 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM de ADP (o metabolito a incorporar) en un volumen final de 2 ml. La solución se agregó a tubos los cuales se pusieron en un baño a 45 °C y se inyectaron los lípidos en una atmósfera de N<sub>2</sub>, formándose agregados lipídicos, los cuales se sometieron a radiaciones ultrasónicas durante 4 min, en presencia de N<sub>2</sub>, obteniéndose liposomas, los cuales fueron analizados por microscopia electrónica y densitometría de flujo. [Szoka y Papahadjopoulos, 1980]

h. *RECONSTITUCIÓN DE LA ADENÍN NUCLEÓTIDO TRANSLOCASA EN LIPOSOMAS*. Se mezclaron los liposomas obtenidos con 300 µg de proteína previamente purificada de partículas submitocondriales de los tres tipos tiroideos y se pasaron a una resina de Bio-Beads MS-2<sup>MR</sup> (3 g/ml de mezcla) preequilibrada con KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.6 (o KCl 125 mM, Tris 10

mM pH 7.3). Se agitó durante 60 min en frío, se separó la mezcla de la resina y se pasó por una columna de sephadex G-50 de 20 cm de alto por 1 cm de ancho, preequilibrada con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM de, (o KCl 125 mM, Tris 10 mM pH 7.3). Se recuperaron los proteoliposomas y se concentraron a 45 000 rpm durante 60 min. Finalmente se resuspendieron en 2 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM y se les determinó la proteína por el método de Lowry.

- i. *RECAMBIO DE ADENÍN NUCLEÓTIDOS EN LIPOSOMAS* Los proteoliposomas formados en presencia de ADP 30 mM, se incubaron en presencia de [ $^3\text{H}$ ] ADP con una actividad específica de 1500 cpm/nmol, a diferentes tiempos (0, 10, 20, 30 y 40 seg) y a diferentes concentraciones de [ $^3\text{H}$ ]ADP (5, 10, 30, 60, 80 y 100  $\mu\text{M}$ ) en un medio que contenía KCl 125 mM, HEPES 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, pH 7.6. Se detuvo la reacción con 1  $\mu\text{M}$  de carboxiatractilósido, a la mezcla de reacción se le agregó 1 % de sulfato de protamina para lograr la adhesión de las vesículas, se filtraron a través de un filtro Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro para cuantificar la radioactividad acumulada en los proteoliposomas.
- j. *TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD EN LIPOSOMAS POR DETECCIÓN DE UN INDICADOR FLUORESCENTE.* Se formaron vesículas partiendo de 40 mg de lípidos con el método indicado anteriormente, en un medio que contiene KCl 125 mM, Tris 10 mM, pH 7.3 y 1 mM de sulfonato de fluoresceína ( como indicador fluorescente). Una vez formados se les incorporó 300  $\mu\text{g}$  de proteína (ANT) pasando la mezcla de liposomas y proteína a una resina de Bio-Beads<sup>MR</sup> (3 g/ml de mezcla) se dejó en agitación por 60 min y se pasaron por una columna de sephadex G-

50 de 1x20 cm, para eliminar el colorante no incorporado a los proteoliposomas, posteriormente se concentraron a 45 000 rpm durante 60 min, finalmente se resuspendió en 2 ml de KCl 125 mM, Tris 10 mM, pH 7.3. Ya obtenidos los proteoliposomas se incubaron 3 mg de fosfolípidos en un ml de medio que contiene KCl 125 mM, Tris 10 mM pH 7.3 con diferentes concentraciones de cadmio (10-300  $\mu$ M) y diferentes concentraciones de ácido mirístico (50-200  $\mu$ M) en presencia de calcio 100  $\mu$ M, se incubaron por 10 min a 30 °C, se les agregó 1 % de sulfato de protamina, se centrifugaron a 16 000 rpm por 5 min para separar la fluorescencia externa e interna. Finalmente se midió el sulfonato de fluoresceína externo e interno en un espectrofluorómetro a 505 nm de excitación y 556 nm de emisión [Chen y Knutson 1988].

k. *DETERMINACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS TOTALES*. Se realizó con la medición indirecta de fosfatos, por medio de la técnica de Fiske y SubbaRow. Se partió de 10 mg de mitocondrias provenientes de ratas eutiroideas, hipertiroideas o hipotiroideas. La extracción de lípidos se realizó como se indica anteriormente. El extracto final de lípidos se resuspendió en un volumen conocido de cloroformo. Se tomaron 30  $\mu$ l, se evaporaron con  $N_2$  y se agregó 1 ml de PCA (ácido perclórico) al 70 %, se calentó durante 1 hr a 100 °C, una vez transcurrido ese tiempo se agregó 0.4 ml de  $H_2SO_4$  10 N y se dejó hidrolizando toda la noche, terminado el hidrolizado se agregó 2 gotas de  $H_2O_2$  hasta blanquear las muestras. A estas muestras se les determinó fosfato, agregando 1.4 ml de  $H_2O$ , 250  $\mu$ l de molibdato de amonio al 5%, 250  $\mu$ l de  $H_2SO_4$  10 N y 250  $\mu$ l de reactivo de Elon. Se calentaron por 5 min y se leyó a

660 nm. En paralelo se realizó una curva de fosfatos usando como estándar ácido fosfórico [Bartlett, 1959]

Preparación del reactivo de Elon. Pesar 10 g de p-metilaminonaftol sulfato (reactivo de Elon), 30 g de metabisulfito de sodio en 1000 ml de agua destilada.

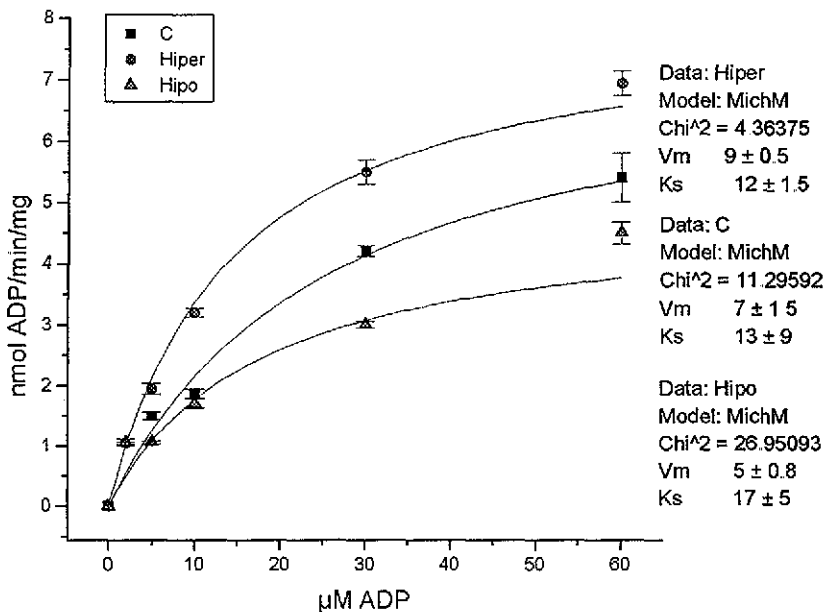
Preparación del molibdato de amonio. Pesar 5 g de Molibdato de amonio, agregar 11 ml de  $H_2SO_4$  y aforar a 100 ml.

*I. DETERMINACIÓN DE CARDIOLIPINA.* Se realizó utilizando la técnica del naranja de acridina. Este indicador se une específicamente a fosfolípidos aniónicos, como son la cardiolipina. La unión a la cardiolipina se debe a la propiedad que tiene el naranja de acridina de dimerizarse al unirse al fosfolípido. La unión se lleva a cabo por interacción electrostática entre la amina cuaternaria del anaranjado de acridina y el residuo de fosfato ionizado [Petit y cols 1992]. La unión del naranja de acridina a la cardiolipina se determinó espectrofotométricamente a 495 nm. A 50  $\mu$ g de mitocondrias se les agregó concentraciones conocidas de naranja de acridina de 0.5  $\mu$ M a 12  $\mu$ M, se incubaron durante 2 min en un medio de sacarosa 0.25 M, Tris 10 mM y se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min. Se determinó el contenido de naranja de acridina en el sobrenadante y por diferencia se cuantifica la cantidad de colorante unido. Se grafican los datos y se obtiene una curva de unión de la cual se determinó el colorante unido y como la relación de pegada es de 2 moléculas del anaranjado de acridina por una de cardiolipina, se determina el contenido de cardiolipina [Petit y cols 1992]

# RESULTADOS

## ACTIVIDAD DE LA ADENIN NUCLEOTIDO TRANSLOCASA EN MITOCONDRIAS

Se estableció la cinética de recambio de adenín nucleótidos en mitocondrias de ratas eutiroideas, hipertiroideas e hipotiroideas Figura 1. Las mitocondrias de ratas hipertiroideas tienen una actividad de recambio 23 % mayor con respecto a las mitocondrias de ratas eutiroideas y 87 % mayor que las mitocondrias hipotiroideas. En las mitocondrias hipotiroideas el recambio de adenín nucleótidos fue 35 % menor respecto a las eutiroideas. Sin embargo las constantes de afinidad no cambiaron significativamente en los tres tipos de mitocondrias. El comportamiento obtenido fue muy semejante al reportado en la literatura, donde se indica que el recambio de ATP/ADP en mitocondrias de ratas hipotiroideas disminuyó en hasta un 25-35 % de la  $V_{max}$  [Mak et. al 1983]. Algunos autores han propuesto que el aumento o disminución en la actividad de recambio se debe a un aumento en el contenido de ANT en los diferentes tipos de mitocondrias. Sin embargo también se ha sugerido que hay un cambio muy significativo en la composición lipídica de la membrana de estas mitocondrias, cambiando la fluidez de la membrana [Schlame y cols 2000]. Los cambios en la composición lipídica también pueden estar involucrados en el aumento o disminución de la actividad de ATP/ADP recambio en mitocondrias de ratas hipertiroideas e hipotiroideas.



**Figura 1.** Recambio de ADP/ADP en mitocondrias de ratas eutiroideas (C), hipertiroideas (Hiper) e hipotiroideas (Hipo), las condiciones experimentales fueron como se indica en métodos. Las constantes cinéticas se calcularon con el programa Origen 5.0, ajustando la curva según la ecuación de Michaelis-Menten. La figura representa un promedio de seis experimentos ± SD.

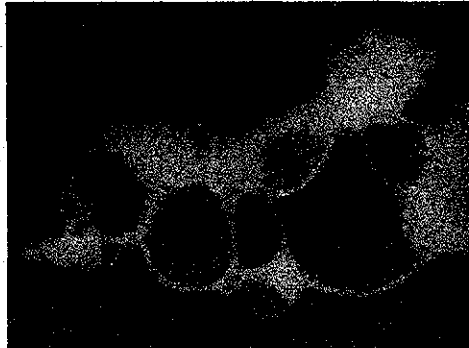
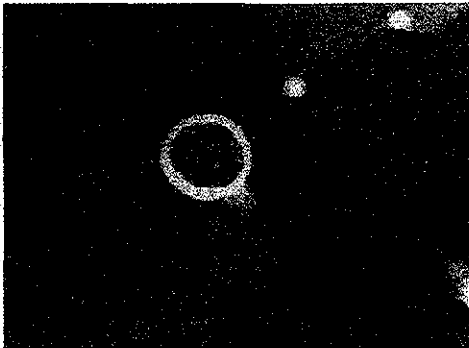
## CALIDAD DE LOS LIPOSOMAS

Por lo mencionado anteriormente en nuestros estudios utilizamos los lípidos obtenidos a partir de mitocondrias obtenidas de ratas hipertiroideas e hipotiroideas para formar liposomas a los cuales eventualmente se les reconstituyó la adenín nucleótido translocasa. Y para ello realizamos algunos experimentos en los cuales analizamos el tamaño y el tipo de estructura de

liposomas formados con lípidos extraídos de membranas en los diferentes estados tiroideos

La Figura 2 panel A muestra el tamaño de los liposomas formados como se describe en materiales y métodos. Dicho análisis se efectuó por microscopía electrónica, observándose que los liposomas son del tipo multilamelar, con un tamaño de entre 1500 y 3000 Å. Por otro lado se realizaron ensayos de citometría de flujo con el fin de observar la complejidad de cada uno de los tipos de liposomas formados con los fosfolípidos provenientes de membranas eutiroideas (FL<sub>C</sub>), hipertiroideas (FL<sub>Hiper</sub>) o hipotiroideas (FL<sub>Hipo</sub>). Con este tipo de ensayos podemos observar tanto la agregación (FSC), como la complejidad (SSC). En la Figura 2 panel B, se muestran los liposomas formados por fosfolípidos de los tres tipos de mitocondrias, los cuales muestran el mismo tipo de agregación y complejidad. La forma de los liposomas no se modificó en presencia de proteína y de calcio, por lo que la medición de las funciones de la ANT no se modificó por la formación de estructuras hexagonales, las cuales se forman en presencia de cardiolipina y altas concentraciones de calcio. Si se formaran estructuras hexagonales en presencia de calcio, la complejidad y la agregación se modificarían, recorriéndose el pico hacia la derecha (Figura 2, panel B) [Epan, 1988, Aguilar, 1999].

Panel A



Panel B

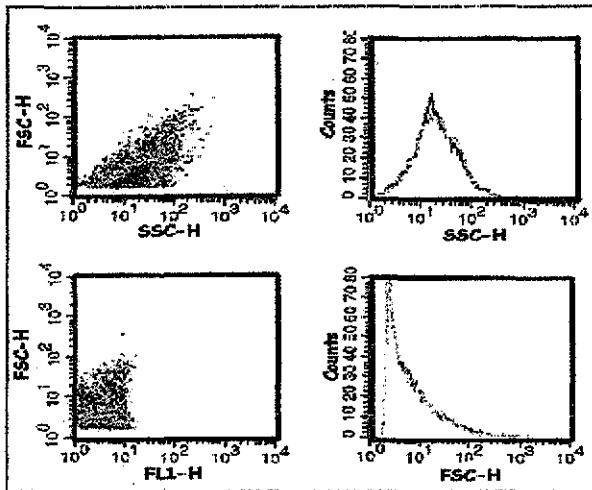


Figura 2. Análisis conformacional de liposomas formados con diferente composición lipídica. Panel A análisis por microscopia electrónica de barrido de liposomas eutiroideos. Panel B, análisis por citometría de barrido, en la cual se presenta el tamaño, el número y la complejidad de los liposomas de FL<sub>C</sub>, FL<sub>Hiper</sub> y FL<sub>Hipo</sub>.

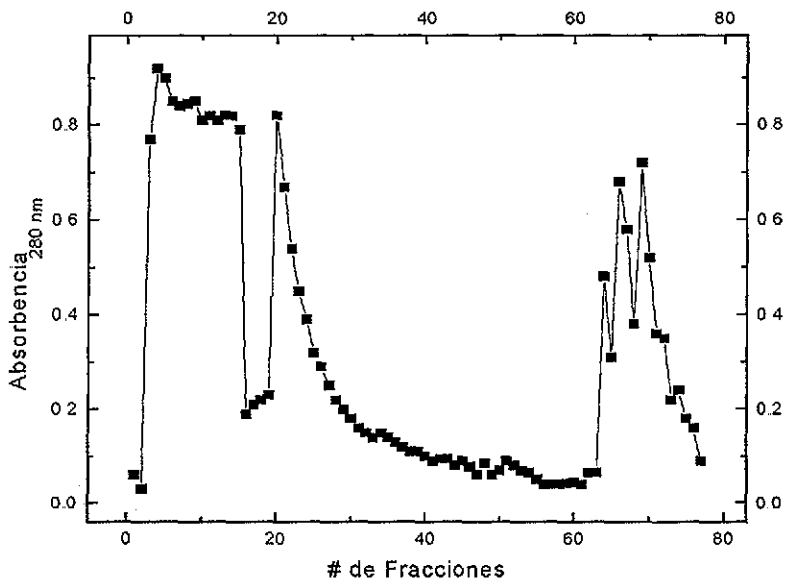


## AISLAMIENTO DE LA ADENIN NUCLEOTIDO TRANSLOCASA.

La idea principal de este trabajo es determinar si el estado tiroideo afecta las funciones de la ANT como consecuencia de una modificación en el contenido de proteína o por cambios en la composición lipídica de la membrana. Para ello se planteó trabajar con un sistema reconstituido en el cual se incorporó la misma concentración de proteína a los liposomas formados por los diferentes tipos membranales y de esta manera determinar si la composición lipídica de la membrana es la que afecta las funciones de la ANT.

La ANT se aisló de mitocondrias de hígado de ratas eutiroideas, hipertiroideas o hipotiroideas. Se utilizaron dos columnas de afinidad, una de hidroxapatita (HTP) en la cual la ANT no se une a la columna junto con otras dos proteínas, tales como el acarreador de fosfatos. Para lograr una mayor purificación se utilizó una segunda columna de azul de sefarosa (BS) siguiendo el procedimiento indicado en materiales y métodos. El perfil de purificación se muestra en la **Figura 3**, en donde las primeras fracciones 1-19, obtenidas del eluado con NaCl 0.5M, MOPS 10 mM, Tritón X-100 0.5 %, pH 7.2, muestran un alto contenido de proteínas, las cuales presentan una baja afinidad por la BS. Posterior al eluado, se aplicó un gradiente de NaCl (0.15-3 M), obteniendo una liberación gradual de proteínas (fracciones 20- 59). Al terminar el gradiente se aplicó una solución de NaCl 0.15 M y SDS 0.1 %. En este último eluado se obtuvieron fracciones dentro de las cuales obtuvimos una proteína de 30 KDa (fracciones 60-77). Estas últimas fracciones se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10 %, identificándose una banda de 30 kDa en cada una de las

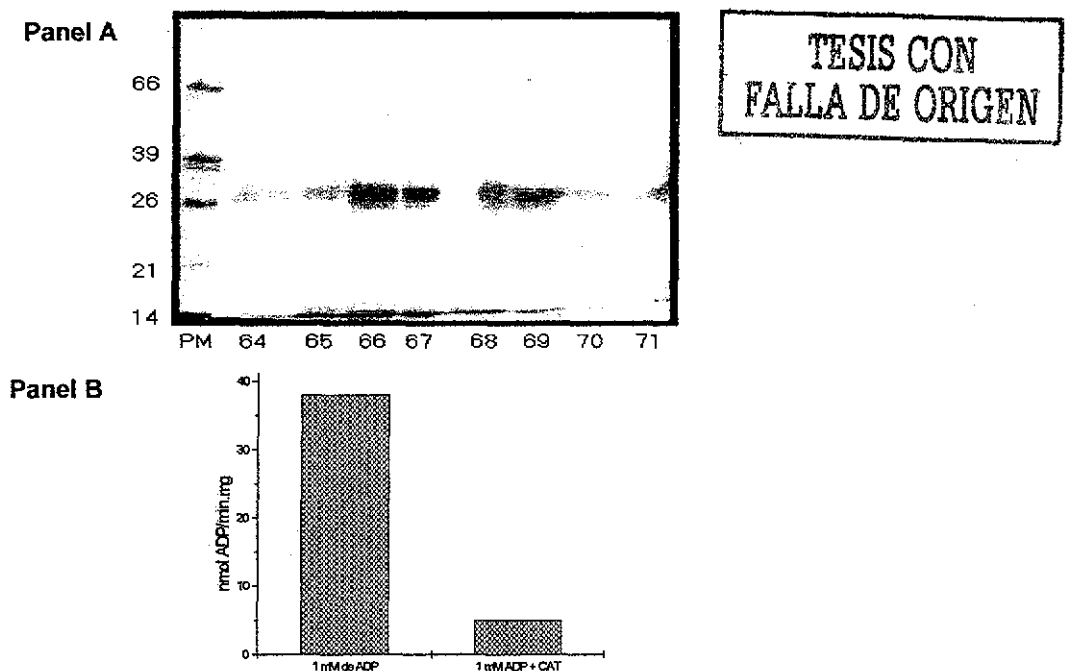
fracciones, como se observa en la **Figura 4 panel A**, en las fracciones 67-69 solo aparece una banda de 30 kDa y en las fracciones 64-66 se observa una proteína de 60 kDa que podría ser el dímero de la misma proteína



**Figura 3.** Perfil de purificación de la adenín nucleótido translocasa obtenido durante las diferentes eluciones, usando la columna de azul de sefaroza. Las fracciones de la 1-19 muestran la elución con NaCl 0.5 M, MOPS 10 mM, Tritón X-100 0.5%, pH 7.2; las fracciones 20-59 muestran la elución con un gradiente de NaCl 0.15-3 M y las fracciones 60-77 muestran la elución con 0.15 M de NaCl y 0.1 % de SDS

Una vez obtenida la proteína de 30 kDa, se mezclaron todas las fracciones 66-70 y se reconstituyeron 300  $\mu$ g de la mezcla, en liposomas que contenían ATP interno con el fin de medir la actividad de la adenín nucleótido translocasa (ANT), estos liposomas fueron preparados a partir de lípidos extraídos de mitocondrias de hígado de ratas eutiroides (FL<sub>C</sub>) El recambio se llevó a cabo agregando ADP 1

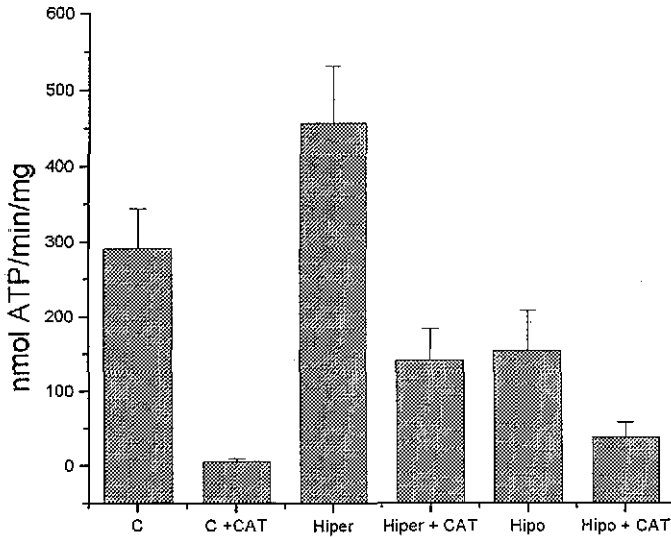
mM, observando la salida de ATP por medio de un ensayo acoplado a enzimas y sustratos como son hexocinasa, glucosa, glucosa-6-fosfo deshidrogenasa y NADP, midiendo la aparición de NADPH a 340 nm, observándose un recambio de 38.5 nmolATP/min/mg de proteína, inhibido hasta 5 nmolATP/min/mg de proteína en presencia de carboxiatractilósido 2  $\mu$ M, como se muestra en la **Figura 4 panel B**. El carboxiatractilósido inhibió en un 87 % el transporte, por lo tanto, la proteína reconstituida corresponde a la adenín nucleótido translocasa.



**Figura 4. panel A.** Análisis de las fracciones por gel de poliacrilamida al 10 % después de eluir con 0.15 M de NaCl y 0.1% de SDS en la columna de azul de sefrosa, en el primer carril se muestran los marcadores de peso molecular (PM), en los demás carriles se muestran las fracciones obtenidas de la elución *Panel B* Actividad de las fracciones 66-69 en un sistema reconstituido en liposomas de membrana interna mitocondrial de ratas eutiroideas, la actividad se inhibió en presencia de carboxiatractilósido (CAT) 2  $\mu$ M. La figura muestra un experimento representativo.

## AISLAMIENTO Y RECONSTITUCION DE LA ANT DE LOS DIFERENTES TIPOS DE MITOCONDRIAS

Con el mismo método de purificación se procedió a aislar la ANT de mitocondrias de hígado de ratas hipertiroideas e hipotiroideas obteniéndose el mismo perfil de purificación para cada una. Las respectivas ANT obtenidas se reconstituyeron (300  $\mu\text{g}$  de proteína) en liposomas formados con  $\text{FL}_C$ ,  $\text{FL}_{\text{Hiper}}$  o  $\text{FL}_{\text{Hipo}}$ . En los liposomas de  $\text{FL}_C$  se reconstituyó la ANT de mitocondrias eutiroideas ( $\text{ANT}_C$ ), en los de  $\text{FL}_{\text{Hiper}}$  la ANT de mitocondrias hipertiroideas ( $\text{ANT}_{\text{Hiper}}$ ) y en los  $\text{FL}_{\text{Hipo}}$  la ANT de mitocondrias hipotiroideas ( $\text{ANT}_{\text{Hipo}}$ ). El recambio se midió como se mencionó en materiales y métodos. En la **Figura 5** se observa que los proteoliposomas de  $\text{FL}_{\text{Hiper}}\text{-ANT}_{\text{Hiper}}$  muestran un 57 % mas de actividad que los proteoliposomas de  $\text{FL}_C\text{-ANT}_C$  y mas del 100% con respecto a los proteoliposomas de  $\text{FL}_{\text{Hipo}}\text{-ANT}_{\text{Hipo}}$ . Por lo tanto, bajo estas condiciones el recambio no se ve afectado directamente por el contenido de ANT, ya que se reconstituyó la misma cantidad de proteína en cada una de las membranas, teniendo como única variable el tipo de membrana, por lo que podemos decir que la composición lipídica influye en la actividad del ANT en los diferentes estados tiroideos.

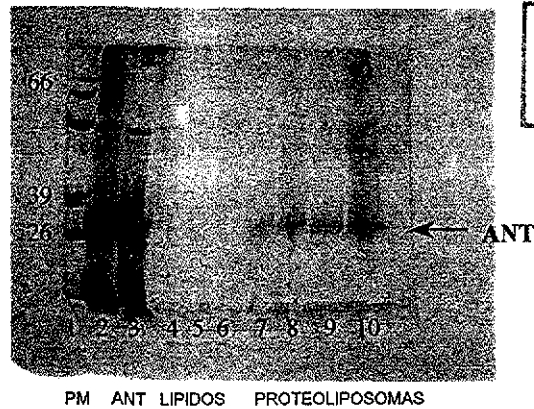


**Figura 5.** Recambio de ADP/ATP en un sistema reconstituido con proteoliposomas de FL<sub>C</sub>-ANT<sub>C</sub> (C), FL<sub>Hiper</sub>-ANT<sub>Hiper</sub> (Hiper) y FL<sub>Hipo</sub>-ANT<sub>Hipo</sub> (Hipo) inhibida con carboxiatractilósido (CAT) 2  $\mu$ M. Se determinó el recambio mediante la salida de ATP de las vesículas, midiendo el ATP por aparición de NADPH a 340 nm en presencia de Glucosa 10 mM, hexocinasa 5 U, glu-6-P-deshidrogenasa 5 U y NADP 1 mM. La figura representa el promedio de 4 experimentos diferentes  $\pm$  SD

### CINÉTICA DE RECAMBIO DE LA ANT EN UN SISTEMA RECONSTITUIDO.

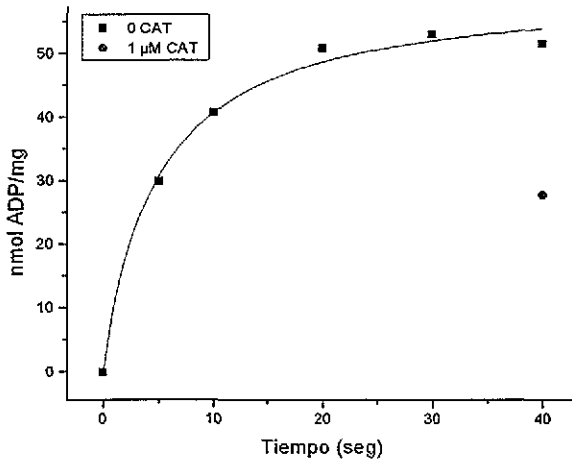
Con el fin de establecer firmemente el efecto del estado tiroideo sobre la función de la ANT, se procedió a medir la cinética de recambio en proteoliposomas de mitocondrias provenientes de animales en cada uno de los estados tiroideos, reconstituyendo la ANT obtenida de la primera columna (hidroxiapatita) y formando los liposomas en presencia de ADP 30 mM. La ANT se reconstituyó como se describe en materiales y métodos

En la figura 6, se muestra un gel de poliacrilamida al 10 % teñido con plata donde se aprecia la purificación de la ANT con hidroxapatita (carriles 2 y 3), en el mismo gel se corrió una muestra de 15  $\mu$ l liposomas sin ANT (carriles 4,5 y 6) y liposomas con el ANT reconstituido (carriles 7-10), como se puede observar en la figura 6, la fracción purificada de ANT tiene contaminantes de bajo peso molecular. Sin embargo al reconstituir esta fracción sólo se logra observar una sola banda de 30 kDa, lo que sugiere que se reconstituyó la ANT.



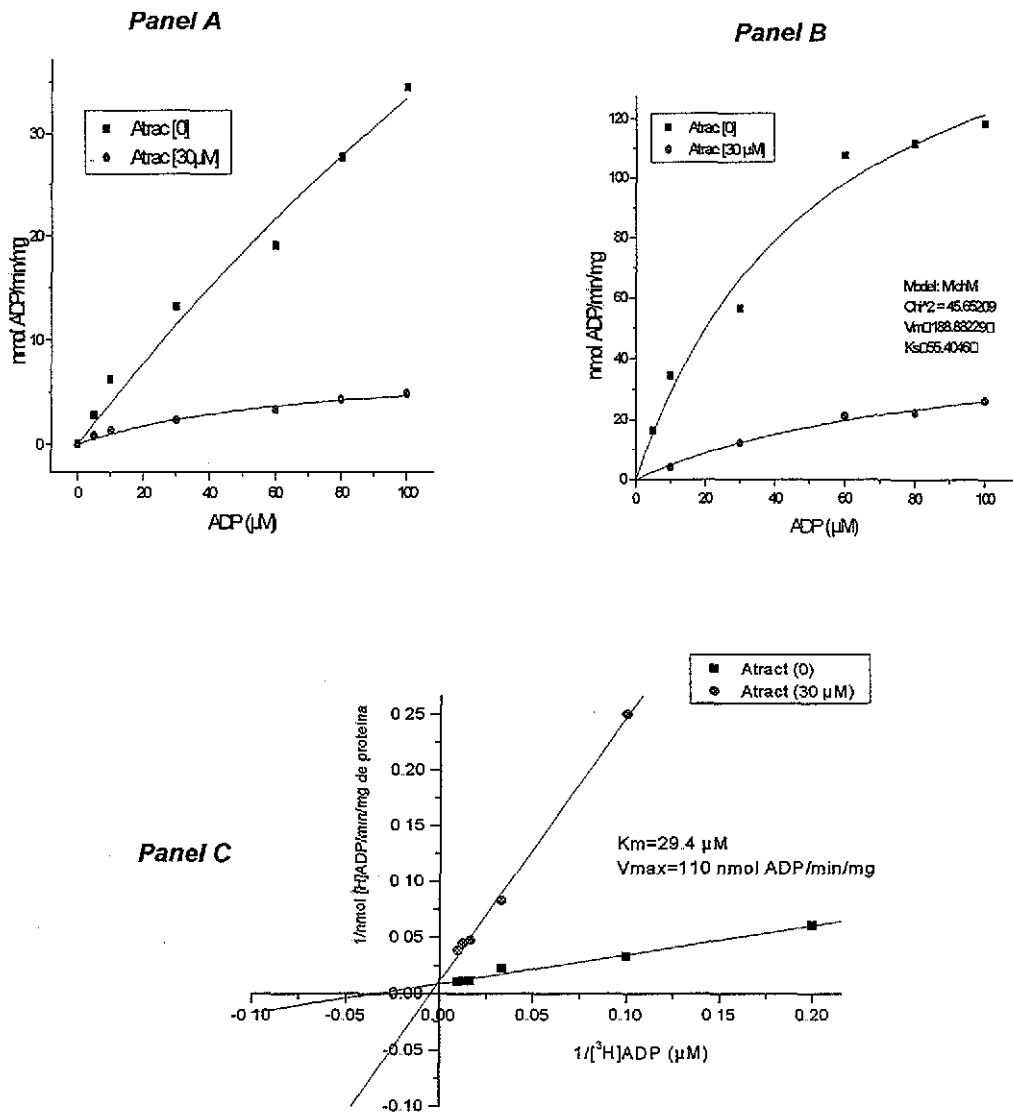
**Figura 6.** Gel de poliacrilamida teñido con plata. Carril 1 representa los marcadores de peso molecular (PM), carril 2 y 3 muestra la fracción purificada de ANT con hidroxapatita, carril 4-6 liposomas sin ANT y carril 7-10 liposomas con el ANT reconstituido.

Una vez obtenidos los proteoliposomas formados con  $FL_C$ - $ANT_C$ , se midió el recambio agregando 60 nmol de  $[^3H]ADP$  a diferentes tiempos, observándose un recambio máximo de 90.04 nmolADP/min/mg a los 40 segundos, el cual fue inhibido a 25 nmolADP/min/mg de proteína en presencia de carboxiatractilósido 2  $\mu$ M, como se muestra en la Figura 7.



**Figura 7.** Recambio de ADP/[<sup>3</sup>H]ADP en presencia de 60 nmol de [<sup>3</sup>H]ADP a tiempos de 10, 20, 30 y 40 segundos. El círculo cerrado representa la inhibición con 1 μM de CAT a los 40 segundos de recambio. Se utilizaron proteoliposomas de FL<sub>C</sub>-ANT<sub>C</sub>. La figura representa un experimento representativo.

Una vez obtenida la curva de tiempo se procedió a realizar una cinética de recambio a diferentes concentraciones de [<sup>3</sup>H] ADP tomando el tiempo de 30 seg a 4 °C y 25 °C. La **Figura 8 panel A**, muestra la cinética de recambio a 4 °C, inhibido en presencia y en ausencia de 30 μM de atractilósido. A esta temperatura se obtuvo una cinética de recambio en la cual no se llegó a una saturación máxima. En la **Figura 8 panel B**, se muestra una cinética de recambio hiperbólica a 25 °C. Al realizar un gráfico de linearización (doble recíproco) obtenemos los parámetros cinéticos característicos de la ANT con una Km de 29.4 μM y una Vmax de 110 nmol ADP/min/mg de proteína, con un patrón de inhibición tipo competitivo (**Figura 8 panel C**). La Km y la Vmax son muy cercanos al que se ha reportado en la literatura cuya Km oscila entre 10-30 μM y la Vmax entre 100-200 nmol/min/mg de proteína en mitocondrias de mamífero [Vignais, 1976].



**Figura 8** Recambio de la ANT<sub>C</sub> reconstituida en liposomas de FL<sub>C</sub>. **Panel A**, muestra el recambio a diferentes concentraciones de [<sup>3</sup>H]ADP (■) e inhibido con atractilósido 30  $\mu$ M (●) a 4°C. **Panel B**, muestra el mismo recambio pero a 25°C. **Panel C**, muestra la linearización (doble recíproco) de la cinética de recambio a 25°C, con un patrón de inhibición tipo competitivo. La figura representa un experimento representativo.

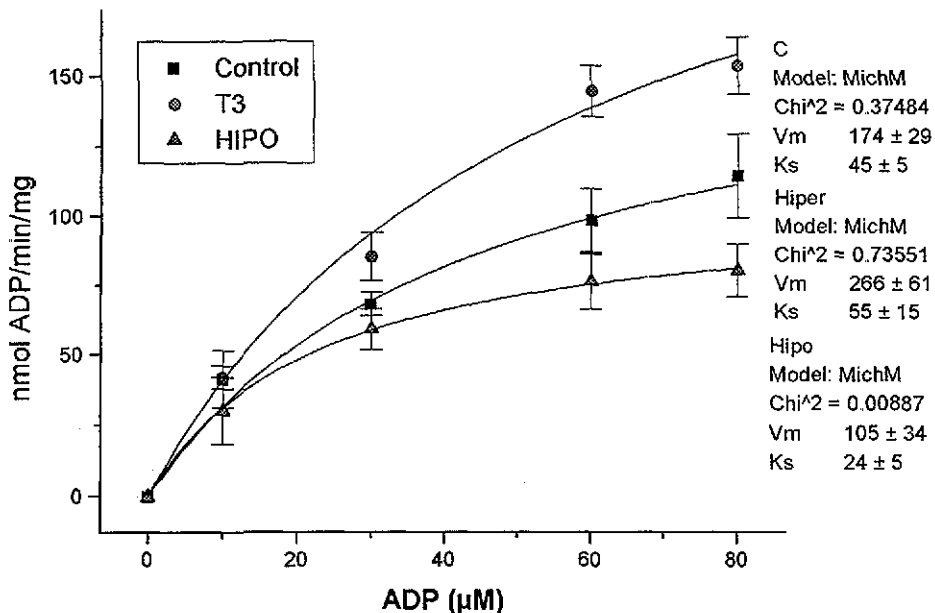


## EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA SOBRE LA CINÉTICA DE LA ADENÍN NUCLEÓTIDO TRANSLOCASA

Dado que uno de los objetivos que se plantearon fue determinar si el contenido de ANT en mitocondrias de ratas hipertiroideas e hipotiroideas influye en una mayor o menor actividad, procedimos a evaluar los parámetros cinéticos en un sistema reconstituido en el cual se incorporó la misma concentración de proteína (300 µg) de cada uno de los ANT aislados en liposomas formados con FL<sub>C</sub>, FL<sub>Hiper</sub> o FL<sub>Hipo</sub>. La reconstitución se llevó a cabo como se indica en materiales y métodos.

Una vez obtenidos los proteoliposomas, se determinó la concentración de proteína incorporada en los tres tipos, obteniendo una concentración muy cercana entre los tres sistemas reconstituidos. En proteoliposomas formados por FL<sub>C</sub>-ANT<sub>C</sub> de los 300 µg de ANT añadidos se incorporaron  $236 \pm 64$  µg. En proteoliposomas de FL<sub>Hiper</sub>-ANT<sub>Hiper</sub>  $257 \pm 44$  µg y en proteoliposomas de FL<sub>Hipo</sub>-ANT<sub>Hipo</sub>  $261 \pm 32$  µg. En la **Figura 9** se muestra la actividad de la ANT<sub>C</sub> reconstituida en liposomas de FL<sub>C</sub>, ANT<sub>Hiper</sub> en liposomas de FL<sub>Hiper</sub> y ANT<sub>Hipo</sub> en liposomas de FL<sub>Hipo</sub>. Los proteoliposomas de FL<sub>Hiper</sub>-ANT<sub>Hiper</sub> presentan una V<sub>max</sub> 1.5 veces mas alta con respecto a los proteoliposomas de FL<sub>C</sub>-ANT<sub>C</sub> y 2.5 veces mas con respecto a los proteoliposomas de FL<sub>Hipo</sub>-ANT<sub>Hipo</sub>, estos últimos presentan una actividad 1.6 veces menor con respecto a los proteoliposomas de FL<sub>C</sub>-ANT<sub>C</sub>. Por lo que la actividad de la ANT<sub>Hiper</sub> es mas alta a pesar de que se incorporó la misma concentración de proteína. Esto nos hace pensar que la

composición lipídica es la responsable de los cambios en actividad y no el aumento o disminución en el contenido de ANT en mitocondrias

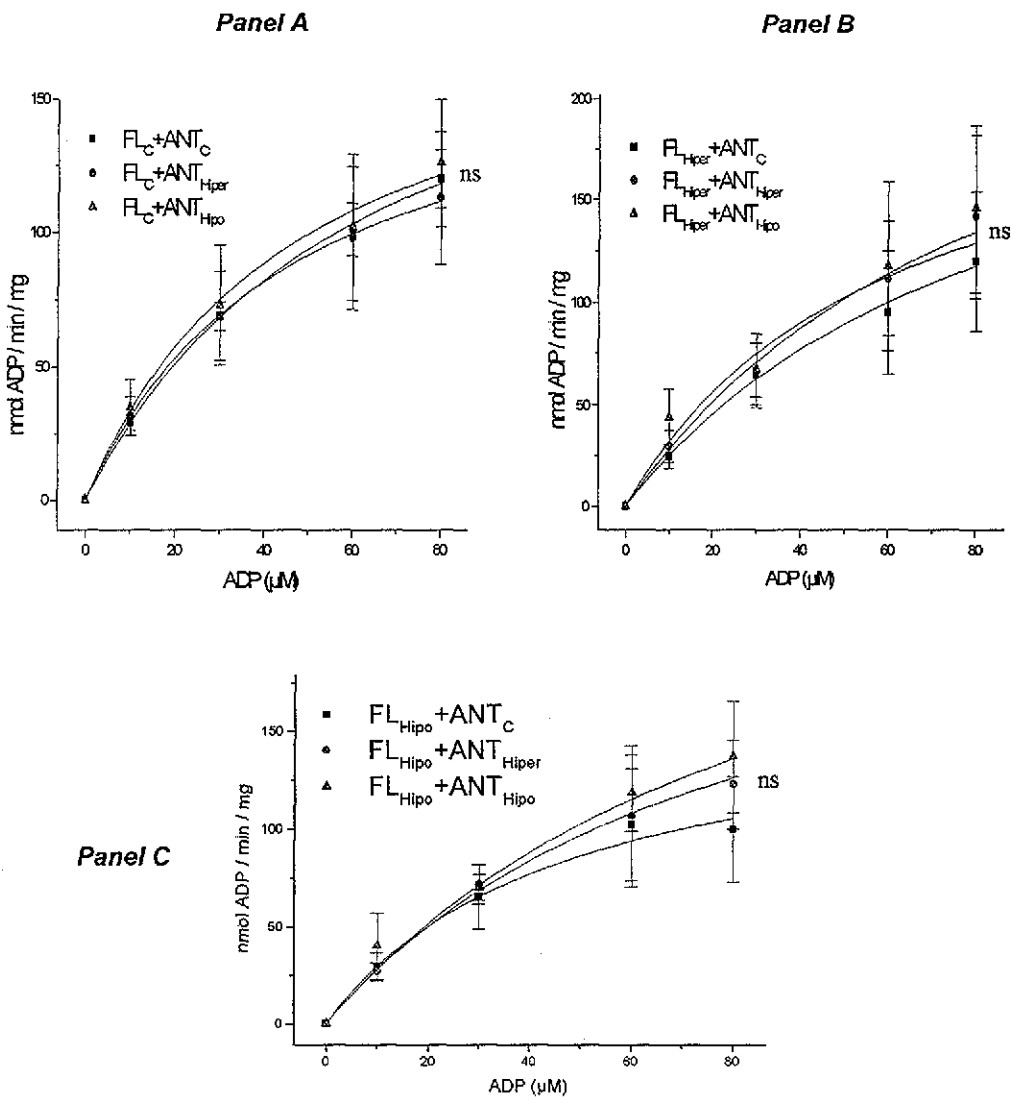


**Figura 9** Actividad de la  $ANT_C$  (C),  $ANT_{Hiper}$  (Hiper) y  $ANT_{Hipo}$  (Hipo) reconstituidas en liposomas formados con  $FL_C$ ,  $FL_{Hiper}$  y  $FL_{Hipo}$  respectivamente. La figura representa 9 experimentos  $\pm$  SD

Con estos resultados, en los cuales se reconstituyó la misma concentración de proteína, se puede concluir parcialmente que la actividad de la ANT se modifica dependiendo del ambiente lipídico. Con el fin de obtener datos más concluyentes, se realizaron experimentos de reconstitución en los cuales se incorporó la misma concentración de la  $ANT_C$ ,  $ANT_{Hiper}$  y  $ANT_{Hipo}$  en liposomas

formados con FL<sub>C</sub>. A estos proteoliposomas se les midió el recambio y se observó que la actividad de las diferentes ANT fue la misma, como se muestra en la **Figura 10 panel A**. Al reconstituir los ANT en liposomas formados con FL<sub>Hiper</sub> (**Figura 10, panel B**) y liposomas de FL<sub>Hipo</sub> (**Figura 10, panel C**), se observó el mismo comportamiento.

En la **Tabla 1** se resume el comportamiento cinético de las diferentes combinaciones de Fosfolípidos y ANT, observándose que cuando la ANT se incorpora en liposomas formados con FL<sub>Hiper</sub> la V<sub>max</sub> se incrementa significativamente con respecto a los liposomas de FL<sub>C</sub> y a los liposomas de FL<sub>Hipo</sub>. Sin embargo cuando se incorpora la ANT<sub>C</sub>, ANT<sub>Hiper</sub> y ANT<sub>Hipo</sub> en liposomas formados con FL<sub>Hiper</sub> la actividad es la misma. Lo mismo ocurre cuando se incorporan las ANT en liposomas formados con FL<sub>Hipo</sub> y liposomas de FL<sub>C</sub>. Por lo tanto la actividad de la ANT aumenta o disminuye dependiendo del ambiente lipídico en el cual se encuentre. Por otro lado la afinidad de la ANT (K<sub>s</sub>) también *cambia significativamente cuando el ambiente lipídico se modifica. Por lo tanto podemos sugerir que la ANT de alguna manera podría estar cambiando su conformación y modificar su actividad*



**Figura 10.** Actividad de la ANT<sub>C</sub>, ANT<sub>Hiper</sub> y ANT<sub>Hipo</sub> en liposomas formados con los tres tipos de fosfolípidos. **Panel A**, proteoliposomas formados con FL<sub>C</sub> y las diferentes ANT. **Panel B**, proteoliposomas de FL<sub>Hiper</sub> y los tres ANT. **Panel C**, proteoliposomas de FL<sub>Hipo</sub> y las diferentes ANT. Cada figura representa 3 experimentos ± SD. ns = no hay diferencia significativa

FOSFOLIPIDOS	ANT	Vmax (nmolADP/min/mg)	Ks (µM)
C	C	174.49±29.8 <sup>a</sup> (n=4)	45.2± 4.8 <sup>d</sup> (n=4)
	Hiper	175±35 (n=3)	45.5±3.3 (n=3)
	Hipo	192.7±28 (n=3)	46.8±13.8 (n=3)
Hiper	C	248±47 (n=3)	88.7±23 (n=4)
	Hiper	266.2±36 <sup>b</sup> (n=4)	55±14.9 <sup>e</sup> (n=4)
	Hipo	266±61 (n=3)	60.2±8.6 (n=3)
Hipo	C	154.6±22 (n=3)	39.24±8.8 (n=3)
	Hiper	198.49±92 (n=3)	52.91±8.6 (n=3)
	Hipo	105.36±34 <sup>c</sup> (n=4)	23.8±5.15 <sup>f</sup> (n=4)

Tabla 1. Comportamiento cinético de las diferentes combinaciones de liposomas y ANT  
En donde a, b y c son significativamente diferentes con una  $p < 0.05$ . Y d, e y f  
son diferentes con una de  $p < 0.05$

### CONTENIDO DE CARDIOLIPINA.

La concentración mitocondrial de cardiolipina cambia dependiendo del estado tiroideo. En mitocondrias de ratas hipertiroideas aumenta, y disminuye en hipotiroideas [Paradies y cols 1990a]. Por otro lado, se sabe que la cardiolipina es esencial para la actividad de la ANT ya que se encuentra fuertemente unida a ella [Beyer y Klingenberg, 1985]. Por lo que era necesario cuantificar el contenido de cardiolipina presente en nuestras mitocondrias, para determinar si los cambios en actividad son debidos al aumento o disminución de este fosfolípido. La determinación se realizó utilizando un indicador altamente específico para la cardiolipina, el naranja de acridina es capaz de unirse a fosfolípidos aniónicos,

como son la cardiolipina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol, con una Kd de 10-30  $\mu\text{M}$  para la cardiolipina.

En la Tabla 2 se muestra que el contenido de fosfolípidos totales en mitocondrias de ratas eutiroideas e hipertiroideas es significativamente el mismo y se encuentra disminuido en mitocondrias de ratas hipotiroideas. El contenido de cardiolipina en mitocondrias eutiroideas equivale a un 22 % de los fosfolípidos totales. En mitocondrias hipertiroideas el contenido de cardiolipina equivale a un 32 % de los fosfolípidos totales, 13 % más que en las eutiroideas. En mitocondrias hipotiroideas hay un 18.8 % de cardiolipina, 17 % menos que en las hipertiroideas y 6 % menos que en las eutiroideas.

CONDICIÓN	FOSFOLÍPIDOS TOTALES (nmol/mg de proteína)	CARDIOLIPINA (nmol/mg de proteína)
Eutiroideas	120 $\pm$ 8.7 (n=6)	26.6 $\pm$ 10.7 (n=3)
Hipertiroideas	134 $\pm$ 5.78* (n=3)	43 $\pm$ 7.2* (n=3)
Hipotiroideas	106 $\pm$ 12.07 (n=4)	20 $\pm$ 8.8 (n=3)

**Tabla 2.** Cuantificación de fosfolípidos totales y cardiolipina por el método de fosfatos descrito en materiales y métodos y naranja de acridina en mitocondrias de ratas eutiroideas, hipertiroideas e hipotiroideas. \* significativamente diferentes con una  $p < 0.05$

### TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD EN LIPOSOMAS

Otro de los objetivos importantes fue demostrar la participación que tiene la ANT en la formación de un poro inespecífico; el llamado poro de la transición de la permeabilidad. Como es sabido, en mitocondrias de ratas hipertiroideas la transición de la permeabilidad ocurre rápidamente en presencia de calcio, lo cual

se ha atribuido al alto contenido de ANT en estas mitocondrias [Schönfeld y cols 1997]. Sin embargo, la cardiolipina también juega un papel muy importante en este fenómeno, ya que se ha descrito que al interactuar con el calcio se promueve la transición de la permeabilidad [Brustovetsky y Klingenberg, 1996]. Por lo anterior decidimos evaluar este fenómeno en un sistema reconstituido. Para ello se formaron liposomas con FL<sub>C</sub>, FL<sub>Hiper</sub> y FL<sub>Hipo</sub>, incorporando su respectivo ANT como se hizo en el recambio de adenín nucleótidos

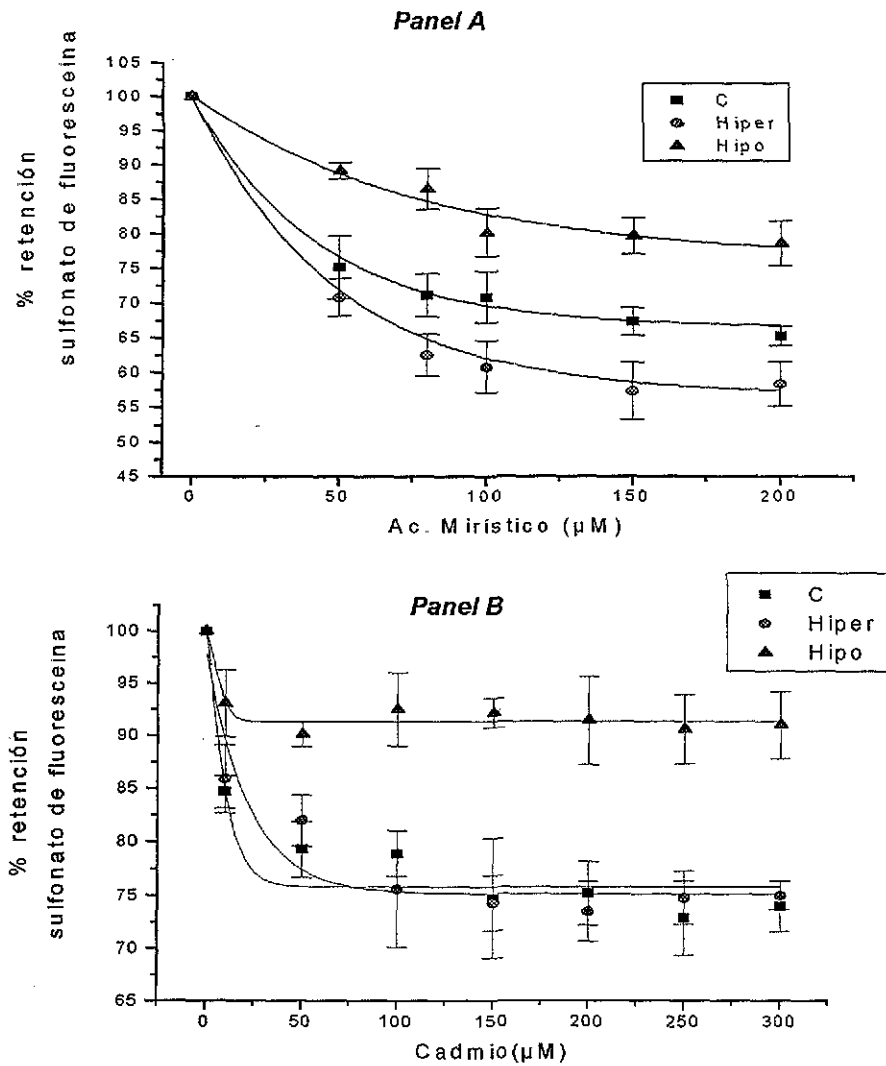
A estos liposomas se les incorporaron 300 µg de ANT, usando las técnicas de reconstitución mencionadas en materiales y métodos. La transición de la permeabilidad se detectó midiendo la salida de sulfonato de fluoresceína de los proteoliposomas, promovida en presencia de inductores de la TPM como el cadmio, el cual es un modificador de grupos tioles [Zazueta y cols 2000] y el ácido mirístico cuyo efecto es a través de la ANT, en presencia de 100 µM de calcio [Wieckowski y cols 2000]. La salida de fluoresceína se detectó midiendo la cantidad de indicador dentro y fuera de los proteoliposomas, antes y después de la inducción de la TPM con los diferentes inductores.

La **Figura 11 panel A** muestra la transición de la permeabilidad inducida por ácido mirístico en presencia de calcio, observándose que hay una mayor liberación del compuesto incorporado en proteoliposomas de FL<sub>Hiper</sub>-ANT<sub>Hiper</sub> con respecto a los proteoliposomas de FL<sub>C</sub>-ANT<sub>C</sub> e FL<sub>Hipo</sub>-ANT<sub>Hipo</sub>. Por lo que los proteoliposomas de FL<sub>Hiper</sub>-ANT<sub>Hiper</sub> son más propensos a la TPM ocurriendo lo contrario en proteoliposomas de FL<sub>Hipo</sub>-ANT<sub>Hipo</sub>. Se incorporó la misma concentración de proteína (ANT) en los tres tipos de proteoliposomas. Por otro lado bajo las mismas condiciones se determinó la TPM usando como inductor al

Cadmio (**Figura 11 panel B**), y se observó que el cadmio no indujo la TPM en proteoliposomas de FL<sub>Hipo</sub>-ANT<sub>Hipo</sub>, pero sí en proteoliposomas de FL<sub>Hiper</sub>-ANT<sub>Hiper</sub> y de FL<sub>C</sub>-ANT<sub>C</sub>. En este caso no existen diferencias significativas en el aumento o disminución de la TPM entre los diferentes proteoliposomas de FL<sub>C</sub>-ANT<sub>C</sub> y FL<sub>Hiper</sub>-ANT<sub>Hiper</sub>, que liberan el 35 % del colorante, pero sí con respecto a los proteoliposomas de FL<sub>Hipo</sub>-ANT<sub>Hipo</sub> que liberan el 9 % del colorante incorporado.

Por lo tanto, estos resultados nos indican que el contenido de ANT presente en mitocondrias de ratas hipertiroideas no es el único factor que interviene en el fenómeno de transición de la permeabilidad. Por lo que consideramos que la composición lipídica de la membrana, es importante para el establecimiento de la TPM.



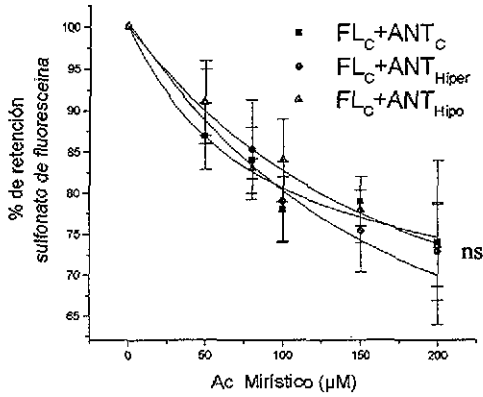


**Figura 11.** Transición de la permeabilidad en un sistema reconstituido **Panel A** muestra la TPM inducida con 50, 80, 100, 150 y 200  $\mu\text{M}$  de ácido mirístico y 100  $\mu\text{M}$  de calcio. **Panel B**, TPM inducida en presencia de 10, 50, 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{M}$  de cadmio. En los tres tipos de proteoliposomas. La TPM se midió como se indica en materiales y métodos con un tiempo de incubación de 10 min a 30 °C. Los gráficos representan 4 experimentos diferentes  $\pm$  SD

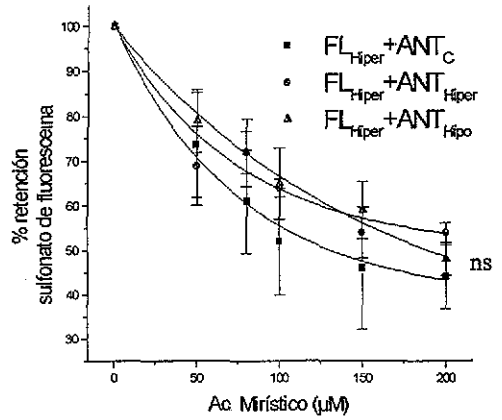
La importancia de la composición lipídica en la TPM fue corroborada al medir la TPM inducida con ácido mirístico en proteoliposomas formados con FL<sub>C</sub> y ANT<sub>C</sub>, ANT<sub>Hiper</sub> o ANT<sub>Hipo</sub> (Figura 12, panel A), observándose que la TPM no cambia cuando los fosfolípidos son los mismos. A su vez se midió en proteoliposomas formados con FL<sub>Hiper</sub> y las diferentes ANT (Figura 12, panel B) y FL<sub>Hipo</sub> con las tres ANT (Figura 12, panel C), observándose el mismo comportamiento.

La Tabla 3 resume la inducción de la TPM con ácido mirístico y calcio en las diferentes combinaciones de liposomas y ANT. Cuando se indujo la TPM en proteoliposomas formados con FL<sub>C</sub>-ANT<sub>Hiper</sub> y FL<sub>C</sub>-ANT<sub>Hipo</sub> la TPM no cambió, sin embargo ésta es significativamente diferente en los liposomas de FL<sub>Hiper</sub> en los que la TPM fue mayor con respecto a los liposomas de FL<sub>Hipo</sub> y liposomas de FL<sub>C</sub>. Lo mismo ocurrió en liposomas hipotiroideos en donde la TPM fue menor. Con estos resultados confirmamos que la TPM depende de la composición fosfolipídica de la membrana, en la cual la cardiolipina podría estar jugando un papel muy importante dado que esta íntimamente relacionada con la ANT y los cambios en los diferentes tipos de membranas.

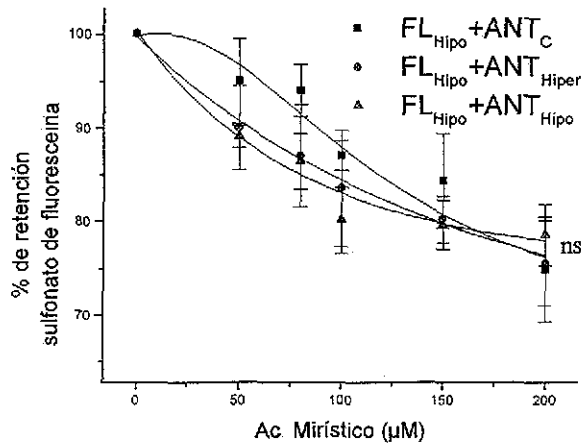
**Panel A**



**Panel B**



**Panel C**



**Figura 12. Transición de la permeabilidad en liposomas formados con FL<sub>C</sub>, FL<sub>Hiper</sub> o FL<sub>Hipo</sub> y ANT de los tres estados tiroideos. Panel A, inducción de la TMP en liposomas de FL<sub>C</sub>. Panel B, liposomas de FL<sub>Hiper</sub>. Panel C, liposomas de FL<sub>Hipo</sub>. ns = no hay diferencia significativa**

FOSFOLIPIDOS	ANT	% RETENCIÓN DE SULFATO DE FLUORESCÉINA (200 $\mu$ M AC. MIRÍSTICO + 100 $\mu$ M $Ca^{2+}$ )
C	C	65.2 $\pm$ 2.8 * (n=3)
	Hiper	72.9 $\pm$ 12 (n=3)
	Hipo	73.6 $\pm$ 10 (n=3)
Hiper	C	44 $\pm$ 14.8 (n=3)
	Hiper	58.3 $\pm$ 6.6 * (n=3)
	Hipo	48 $\pm$ 7.5 (n=3)
Hipo	C	74.8 $\pm$ 5.6 (n=3)
	Hiper	75.5 $\pm$ 4.5 (n=3)
	Hipo	78.5 $\pm$ 3.23 * (n=3)

**Tabla 3.** Transición de la permeabilidad inducida con 200  $\mu$ M de ácido mirístico y 100  $\mu$ M de calcio en las diferentes combinaciones de fosfolípidos y ANT. \* hay diferencia significativa con una  $p < 0.05$

## DISCUSIÓN

Como ya se mencionó anteriormente, la hormona tiroidea influye sobre la actividad de algunas proteínas. En este trabajo se realizaron experimentos, para determinar si el aumento en el contenido de ANT o el cambio en la composición lipídica modifica la actividad de la ANT. Los resultados sugieren que la ANT varía su actividad dependiendo de composición lipídica de la membrana interna mitocondrial. Dado que el contenido de cardiolipina se modifica en el estado tiroideo y además se encuentra fuertemente unida a la ANT [Schlame y cols 1991], se propone que la actividad de la ANT se modifica por los cambios en el contenido de este fosfolípido y no a un aumento en la cantidad de ANT.

En los resultados obtenidos, se observa claramente que la actividad de la ANT aumenta cuando ésta es reconstituida en liposomas formados con FL<sub>Hiper</sub> y disminuye cuando se reconstituye en liposomas de FL<sub>Hipo</sub>. La cantidad de proteína reconstituida es la misma en los tres tipos de membranas. Al reconstituir los diferentes tipos de ANT en liposomas de FL<sub>C</sub> la actividad de la ANT es la misma. Analizando estos resultados y midiendo el contenido de cardiolipina en los tres tipos de membranas podemos concluir que el estado tiroideo no modifica la estructura de la translocasa y que su actividad depende del contenido de cardiolipina presente en la membrana interna mitocondrial.

Beyer y Klingenberg (1985) demostraron que la ANT tiene seis moléculas de cardiolipina; por otro lado Schlame y cols (1991) demostraron que la interacción de la cardiolipina con la ANT no depende del grado de insaturación de las cadenas de ácidos grasos de la cardiolipina. También se han hecho estudios en los cuales

se determinó el grado de insaturación de los ácidos grasos en tejidos hipertiroideos e hipotiroideos, y se encontró que en el hipertiroidismo el grado de insaturación aumenta y en el hipotiroidismo disminuye [Guerrero y cols 1999]. Considerando estos resultados podríamos proponer que el número de cardiolipinas fuertemente unidas serían las mismas en mitocondrias de ratas hipotiroideas e hipertiroideas, dado que la interacción de la cardiolipina con la ANT no depende del grado de insaturación. Por lo tanto, podríamos sugerir, que un cambio en el grado de insaturación podría estar influyendo en la actividad de la ANT además de un aumento o disminución de cardiolipina en la membrana interna mitocondrial, la cual puede estar confiriendo una modificación en la fluidez de la membrana interna en mitocondrias de ratas hipertiroideas e hipotiroideas.

Otros autores argumentan que la actividad de la ANT no solo depende del contenido de cardiolipina, sino que también requiere de otros fosfolípidos, en conjunto con la cardiolipina. Esto lo demostraron reconstituyendo a la ANT en liposomas con diferente composición lipídica, obteniendo una mayor actividad en liposomas que contenían cardiolipina (7-10 %) y fosfatidiletanolamina (92 %) [Krämer, 1980, Hoch, 1992]. En nuestro caso los liposomas formados con fosfolípidos de mitocondrias de los tres estados tiroideas, poseen una variedad de fosfolípidos de los cuales la cardiolipina es el fosfolípido más afectado.

Las mitocondrias de ratas eutiroideas contienen 22 nmol/mg de cardiolipina, 45 nmol/mg de fosfatidiletanolamina, 11 1 nmol/mg de fosfatidilinositol, 1.7 nmol/mg de fosfatidilserina, 81 nmol/mg de fosfatilcolina, 16 nmol/ de colesterol. En mitocondrias hipertiroideas el contenido es de 34 nmol/mg de cardiolipina, 52.7 nmol/mg de fosfatidiletanolamina, 11 nmol/mg de fosfatidilinositol, 2 nmol de

fosfatidilserina, 79 nmol/mg de fosfatidilcolina y 12 de colesterol [Paradies y Ruggiero 1990]. Las diferencias más claras están en el contenido de cardiolipina y fosfatidiletanolamina. En este estudio hemos analizado los efectos del cambio en el contenido de cardiolipina.

Por otro lado, se ha demostrado que las mitocondrias de ratas hipotiroideas son más resistentes a sufrir la TPM [Chávez y cols 1998], ocurriendo lo contrario en mitocondrias hipertiroideas. Nuestros resultados demuestran que la inducción de la transición de la permeabilidad depende del ambiente lipídico en la cual se encuentre la ANT. Como se mostró en la Figura 11, la TPM inducida por cadmio, al reconstituir la ANT en liposomas de FL<sub>Hipo</sub>, fue menor debido a que el contenido de cardiolipina en estos liposomas está disminuido, considerando que se reconstituyó la misma cantidad de proteína. Proponemos que en mitocondrias de ratas hipotiroideas la fluidez de la membrana está modificada por el cambio en la composición lipídica, impidiendo que el ANT se transforme en un poro inespecífico al oxidarse los grupos tioles de la proteína en presencia de cadmio, como se ha descrito recientemente en mitocondrias eutiroideas [Zazueta y cols 2000].

Sin embargo, en liposomas de FL<sub>C</sub> y FL<sub>Hiper</sub> la TPM inducida por cadmio es más sensible con respecto a los liposomas de FL<sub>Hipo</sub> debido a que las mitocondrias de ratas hipotiroideas son menos fluidas [Pilarska y cols 1991]; si consideramos que se reconstituyó la misma concentración de proteína y el cadmio solo interactúa con los grupos tioles, la TPM es la misma en los tres casos. Ricchelli y cols (1999) demostraron que la transición de la permeabilidad depende de la fluidez de la membrana, apoyando con esto que los liposomas de FL<sub>Hipo</sub> son más

resistentes a la TPM debido a que son menos fluidos, tal fluidez depende de la composición lipídica de la membrana.

El ácido mirístico en presencia de calcio, es otro agente inductor de la TPM que actúa a través de la ANT en ausencia de un potencial transmembranal [Wieckowski, 2000]. Nuestros resultados coinciden con estos, dado que se obtiene una transición de permeabilidad en un sistema reconstituido en ausencia de potencial. Por otro lado, al igual que con el cadmio, los proteoliposomas de FL<sub>Hipo</sub>-ANT<sub>Hipo</sub> tienen una menor TPM con respecto a los proteoliposomas de FL<sub>C</sub>-ANT<sub>C</sub> y FL<sub>Hiper</sub>-ANT<sub>Hiper</sub>. Cuando se utiliza ácido mirístico como inductor observamos que la TPM cambia dependiendo del tipo de membrana en el cual se encuentre la ANT, como ocurre en el recambio. Esto nos hace suponer que la apertura de la TMP también depende de la composición lipídica. Se ha sugerido que el calcio interactúa directamente con las cargas negativas de la cardiolipina dejando libres las cargas positivas de la ANT, por lo que suponemos de esta forma permite la interacción del ácido mirístico con la ANT que a su vez puede depender de la fluidez de la membrana dada por la composición lipídica de la membrana [Pilarska y cols 1991] promoviendo la formación de un canal inespecífico. Por lo tanto, la apertura del poro depende de la composición de la membrana y los cambios en el contenido de cardiolipina. Esto se demostró midiendo la TPM en un sistema reconstituido, el cual se realizó formando liposomas de un solo tipo de fosfolípidos y reconstituyendo la ANT de los tres tipos de mitocondrias, encontrándose que la TPM no cambia.



## CONCLUSIONES

- En un sistema reconstituido, la actividad de la adenín nucleótido translocasa cambia dependiendo del ambiente lipídico en el cual se encuentre, considerando que en membranas de ratas hipertiroideas aumenta el contenido de cardiolipina y disminuye en el hipotiroidismo.
- El contenido de cardiolipina es importante para el establecimiento de una permeabilidad inespecífica que lleva a la TPM, tomando en cuenta que la concentración de cardiolipina cambia dependiendo del estado tiroideo en la cual se encuentren las mitocondrias

## PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos demostramos que tanto la actividad de la ANT como la TPM cambian dependiendo del ambiente lipídico en el cual se encuentre la proteína. Además sugerimos que el fosfolípido que pudiera estar jugando un papel muy importante en estos cambios es la cardiolipina. Por lo que surge la pregunta de ¿cómo es que la cardiolipina promueve estos cambios, principalmente en la formación del canal inespecífico? Por otro lado, es de interés conocer, si el contenido de cardiolipina fuertemente unida a la ANT cambia en los tres estados tiroideos o solo cambia el grado de insaturación de los ácidos grasos de dicho fosfolípido. Por lo que uno de los objetivos es medir las cardiolipinas fuertemente unidas a la ANT de mitocondrias hipertiroideas, hipotiroideas y eutiroideas y a su vez medir la TPM en ausencia de estas cardiolipinas con el fin de establecer el papel principal de la cardiolipina en la TPM. Otro de los objetivos es medir el grado de los ácidos grasos de la cardiolipina en los tres estados tiroideos.

Por otro lado, se ha reportado que la TPM es un fenómeno que está involucrado en el inicio de la apoptosis [Crompton, 1999; Priault, 1999, Bernardi, 1996] es de interés estudiar si las células de ratas hipotiroideas son más resistentes a sufrir la muerte celular programada, dado que las mitocondrias de ratas hipotiroideas son más resistentes a sufrir la TPM. Considerando los resultados de este trabajo, la composición lipídica de la membrana de estas mitocondrias tendría efectos claros sobre la apoptosis.

## REFERENCIAS

- Aguilar, L., Ortega-Pierres, G., Campos, B., Fonseca, R., Naciff, J.M., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R., Baeza, I. (1999) Phospholipid membranes form specific nonbilayer molecular arrangements that are antigenic. *J. Biol. Chem.* 274:25193-25196
- Bartlett, G.R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234: 466-468
- Bernardi, P. (1996) The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 1275: 5-9
- Beyer, K., Klingenberg, M. (1985) ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by <sup>31</sup>P Nuclear Magnetic resonance. *Biochemistry.* 24. 3821-3826
- Beyer, K., Nuscher, B. (1996) Specific Cardiolipin binding interferes with labeling of sulfhydryl residues in the adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier protein from beef heart mitochondria. *Biochemistry.* 35: 15784-15790
- Bobyleva, V., Paziienza, T.L., Maseroli, R., Tomas, A., Salvioli, S., Cossarizza, A., Franceschi, C. Skulachev, V. P. (1998) Decrease in mitochondrial energy coupling by thyroid hormones a physiological effect rather than a pathological hyperthyroidism consequence. *FEBS Letter*, 430: 409-413
- Brustovetsky, N., Klingenberg, M. (1996) Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into large channel by Ca<sup>2+</sup>. *Biochemistry.* 35:8483-8488.
- Cartwright, J. I. (1993) Separation and analysis of phospholipids by thin layer chromatography. *Methods in Molecular Biology*, 19 153-167

- Chavéz, E , Franco, M , Reyes-Vivas, H., Zazueta, C., Ramírez, J., Carrillo, R (1998) Hypothyroidism renders liver mitochondria resistant to the opening of membrane permeability transition pore. *Biochim. Biophys. Acta.* 61753: 1-6.
- Chen, R. F. and Knutson, J.R. (1988) Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: Energy transfer to nonfluorescent dimmer. *Analytical Biochemistry.* 172 61-77
- Crompton, M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death *Biochem. J.* 341:233-249
- Daum, G. (1985) Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta,* 822: 1-42
- Döner, A., Olesch, M., Giessen, S., Pauschinger, M., Schultheiss, H-P. (1999) Transcription of the adenine nucleotide translocase isoforms in various types of tissues in the rat. *Biochem. Biophys. Acta.* 1417:16-24
- Duyckaerts, C , Sluse-Goffart, C.M., Fux, J-P., Sluse, F. E., Liebecq, C (1980) Kinetic Mechanism of the exchange catalysed by the adenine-nucleotide carrier. *Eur. J. Biochem* 106 1-6
- Epand, R.M. (1998) Lipid polymorphism and protein-lipid interactions *Biochim. Biophys. Acta* 1376:353-368
- Fernández, V., Cornejo, P , Tapia, G. And Videla, L. A. (1997) Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat. *Nitric Oxide Biol. Chemis.* 1(6): 463-468
- Goglia, F., Moreno, M., Lanni, A. (1999) Action of thyroid by thyroid hormones at the cellular level: the mitochondria target. *FEBS Letter,* 452: 115-120
- Guerrero, A., Pamplona, R., Portero-Otin, M , Barja, G , López-Torres, M. (1999) Effect of thyroid status on lipid composition and peroxidation in the mouse liver. *Free Radic. Biol. Med* 26 73-80
- Hackenberg, H and Klingenberg, M (1980) Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate-adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100 *Biochemistry.* 19: 548-555

- Hoch, F.L. (1992) Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1113: 71-133
- Izquierdo M., Jiménez, E., Cuezca, J.M. (1995) Hypothyroidism affects the expresión of the beta-F1-ATPase gene and limits mitochondrial proliferation in rat al all stages of development. *Eur. J. Biochem* 323 344-350
- Kalderon, B., Hermesh, O., Bar-Tana, J. (1995) Mitochondrial permeability transition is induced by in vivo thyroid hormone treatment. *Endocrinology*. 136: 3552-3556
- Klingenberg, M. (1985) Principles of carrier catalysis elucidated by comparing two similar membrane translocations from mitochondria, the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. *Ann. NY Acad. Sci* 456: 279-288
- Klingenberg, M., Nelson, D R. (1994) Structure-function relationships of the ADP/ATP carrier. *Biochim. Biophys. Acta*. 1187: 241-244
- Krämer, R. (1980) Influence of divalent cations on the reconstituted ADP, ANT exchange. *Bioch. Biophys. Acta*. 592: 615-620
- Krämer, R. and Klingenberg, M. (1980) Modulation of the reconstituted adenine nucleotide exchange by membrane potential. *Biochemistry*. 19: 556-560
- Lee, C. P., Ernster, J. (1965). In Symposium on the Regulation of Metabolic Process in Mitochondria (Tager, J., Papa, S., Quagliariello, E., and Slater, E., eds), Vol. 7 Elsevier/North Holland New York, pp 218-234
- Lowry, O Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. J. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 194: 265-275
- Majima, E., Ikawa, K., Takeda, M., Hashimoto, M., Shinohara, Y., Terada, H. (1995) Translocation of loops regulates transport activity of mitochondrial ADP/ATP carrier deduced from formation of a specific intermolecular disulfide bring catalized by copper-o-phenanthroline. *J. Biol. Chem.* 270 29548-29554
- Majima, E., Shinohara, Y., Yamaguchi, N., Hong, Y-M., Terada, H. (1994) Importance of loops of mitochondrial ADP/ATP carrier for its transport

- activity deduced from reactivities of its cysteine residues with the sulfhydryl reagent Eosin-5-maleimide. *Biochemistry*. 33: 9530-9536
- Mak, I. T., Shrago, E., Elson, C.E. (1983) Effect of thyroidectomy on the kinetics of ADP-ATP translocation in liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 226: 317-323
  - Malkevitch, N.V, Dedukhova, V. I., Simonian, R. A., Skulachev, V. P., Starkov, A. A (1997) Thyroxine induces cyclosporin A-insensitive,  $Ca^{2+}$ -dependent reversible permeability transition pore in rat liver mitochondria. *FEBS Letter* 412: 173-178
  - Müller, S., Seitz, H J (1994) Cloning of a cDNA for the FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase from rat liver and its regulation by thyroid hormones. *Biochemistry*. 91: 10581-10585
  - Nelson, B. D , Mutvel, A , Joste, V. (1984) Regulation of biosynthesis of the rat liver inner mitochondrial membrane by thyroid hormone. *Arch. Biochem. Biophys*, 228:41-48
  - Novgorodov, S. A., Gudz, T. I., Kushnareva, E. Y., Zorov, D. B. and Kudrjashov, Y. B. (1990) Effect of ADP/ATP antiporter conformational state on the suppression of the nonspecific permeability of the mitochondrial membrane by cyclosporine A. *FEBS Letter* 277: 123-126
  - Paradies, G , Ruggiero, F (1990a) Enhanced activity of the tricarboxylate carrier and modification of lipids in hepatic mitochondria from hyperthyroid rats. *Arch. Biochem. Biophys*. 278: 425-430
  - Paradies, G., Ruggiero, F. M (1990b) Stimulation of phosphate transport in rat-liver mitochondria by thyroid hormones. *Biochim. Biophys. Acta* 1019: 133-136
  - Paradies, G , Ruggiero, F. M. Petrosillo G , Quagliariello, E. (1997) Alterations in carnitine-acylcarnitine translocase activity and in phospholipid composition in heart mitochondria from hypothyroid rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1362: 193-200

- Paradies, G., Ruggiero, F. M., Petrosillo, G., Quagliariello, E., (1994) Enhanced cytochrome oxidase activity and modification of lipids in Heart mitochondria from hyperthyroid rats *Biochim. Biophys. Acta* 1225: 165-170
- Paradies, G., Ruggiero, F.M., Dinoli, P. (1993) Decreased cytochrome oxidase activity and changes in phospholipids in Heart mitochondria from hypothyroid rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 307: 91-95
- Petit, J.M., Huet, O., Gallet, P.F., Maftah, A., Ratinaud, M.H., Julien, R. (1994) Direct analysis and significance of cardiolipin transverse distribution in mitochondrial inner membranes *Eur. J. Biochem.*, 220:871-879
- Petit J.M., Maftah, A., Ratinaud, M.H., Julien, R (1992) 10N-Nonyl acridine orange interacts with cardiolipin all allows the quantification of this phospholipid in insolated mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 209: 267-273
- Pilarska, M., Wrzosek, A., Pikula, S., Famulski, K.S. (1991) Thyroid hormones control lipid composition and membrane fluidity of skeletal muscle sarcolemma *Biochim. Biophys. Acta*, 1068: 167-73
- Pillar, T.M., Seitz, H.J (1997) Thyroid hormone and gene expression in the regulation of mitochondrial respiratory funtion. *Eur. J. Endocrinology*, 136: 231-239
- Portman, M.A., Xiao, Y., Qian, K., Tucker, R.L., Parish, S.M., Ning Xue-Han. (2000) Thyroid hormone coordinates respiratory control maduration and adenine nucleotide translocator expression in heart in vivo. *Circulation*. 102: 1323-1329
- Priault, M., Chaudhuri, B., Clow, A., Camougrand, N., Manon, S. (1999) Investigation of bax-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 260: 684-691
- Ricchelli, F., Gobbo, S., Moreno, G., Salet, C. (1999) Changes of the fluidity of mitochondrial membranes induced by the permeability transition. *Biochemistry*. 38: 9295-9300
- Robinson, N.C. (1993) Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25: 153-63

- Rojo, M., Wallimann, T. (1994) The mitochondrial ATP/ADP carrier: interaction with detergents and purification by a novel procedure. *Biochim. Biophys. Acta* 1187:360-367
- Rück, A., Dolder, M., Wallimann, T., Brdiczka, D. (1998) Reconstituted adenine nucleotide translocase forms a channel for small molecules comparable to the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Letter.* 426: 97-101
- Scarpulla C.R., Kilar C.M., Scarpulla M. K (1986) Coordinate induction of Multiple Cytochrome c mRNAs in Response to Thyroid Hormone. *J. Biol. Chem* 261 4660-4662
- Schlame, M., Beyer, K., Hayer-Hartl, M., Klingenberg, M. (1991) Molecular species of cardiolipin in relation to other mitochondrial phospholipids is there an acyl specificity of the interaction between cardiolipin and the ADP/ATP carrier?. *Eur. J. Biochem.* 199 459-466
- Schlame, M., Hostettler, K. Y. (1997) Cardiolipin synthase from mammalian mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1348: 207-213
- Schlame, M., Rua, D., Greenberg, M L (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin *Prog. Lipid Res* 39:257-288
- Schönfeld. P., Wiêckowski, M. R., Wojtczak (1997) Thyroid hormone-induced expression of the ADP/ATP carrier its effect on fatty acid-induced uncoupling of axidative phosphorylation. *FEBS Letters*, 416: 19-22
- Skulachev, V. P. (1998) Uncoupling new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1363: 100-124
- Szoka, F. J., Papahadjopoulos, D (1980) Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann. Rev. Biophys. Bioerg.* 9: 467-508
- Vasdev, S C., Korecky, B., Rastogi, R B., Singhal, L. and Kako, K J. (1977) Myocardial lipid metabolism in cardiac hyper- and hypo-function. Studies on triiodothyronine-treated and transplanted rat hearts *Can J. Physiol. Pharmacol.* 55 1311-1319



- Vignais, P. (1976) Molecular and physiological aspects of adenine nucleotide transport in mitochondria *Biochim. Biophys Acta*, 456 1-38
- Wieckowski, M. R., Wojtczak, L. (1998) Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Letter* 423 339-342
- Wieckowski, M.R., Brdiczka, D., Wojtczak, L. (2000) Long-chain fatty acids promote opening of the reconstituted mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Letter*, 484: 61-64
- Woodfield, K., Rück, A., Brdiczka, D., Halestrap, A. P (1998) Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem. J.* 336: 287-290
- Zazueta, C., Reyes-Vivas, H, Zafra, G., Sánchez, C.A, Vera, G., Chávez, E. (1998) Mitochondrial permeability transition as induced by cross-linking of the adenine nucleotide translocase. *J. Biochem. Cell. Biol.* 00: 1-11
- Zazueta, C., Sánchez, C., García, N, Correa, F (2000) Possible involvement of the adenine nucleotide translocase in the activation of the permeability transition pore induced by cadmium *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 32 1093-1101
- Zoratti, M. And Szabo, I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241: 139-176