

00562

9



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

FACULTAD DE QUÍMICA

"INFLUENCIA DE LA HORMONA TIROIDEA SOBRE LA  
SÍNTESIS DEL UNIPORTADOR DE CALCIO EN  
MITOCONDRIAS DE HÍGADO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

QFB. SANDRA GUADALUPE ROBLES HERNÁNDEZ

DIRECTOR: DR. EDMUNDO CHÁVEZ COSSÍO

MÉXICO, D.F.

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Dra. Marieta Tuena de Gómez-Puyou.

**VOCAL:** Dr. Antonio Peña Díaz

**SECRETARIO:** Dra. Rosario A. Muñoz Clares.

**SUPLENTE:** Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

**SUPLENTE:** Dr. Blas Lotina Henssen.

### **Sitio donde se desarrolló el tema.**

Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

### **Director de tesis**

Dr. Edmundo Chávez Cossío.

### **Sustentante**

Sandra Guadalupe Robles Hernández

## **AGRADECIMIENTOS.**

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes instituciones y personas.

Al CONACYT (Proyectos 28666N y 34387N) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo y por la beca (No. de registro 159996) que me otorgo.

Al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" por permitirme llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones.

Al Dr. Edmundo Chávez Cossio por todas sus enseñanzas, consejos, apoyo, comprensión y amistad que me brindo durante todo el tiempo en que trabajamos juntos.

A todos los miembros del departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Por su compañerismo y apoyo.

Muy especialmente a mis compañeros y amigos del laboratorio: Ana Cecilia, Noemí, Francisco y César David por apoyarme en todo momento.

A Caty, Andrea, Alejandra por su cariño, amistad, confianza y comprensión en los momentos más difíciles.

A las personas más importantes que existen en mi vida, mi mamá Oliveria Hernández, mi papá Ismael Robles y mis hermanos Eduardo, Erik, Oscar y Ricardo por todo su amor y comprensión. A Luisa, Marlen, Angélica, Ma. Fernanda, Lili y Andrea por estar a mi lado.

A Alvaro por todo su amor, apoyo, paciencia, comprensión y por estar a mi lado.

A mi abuelita Rosa García y a mi tía Rosa por todo su apoyo y buenos consejos.

A los integrantes del jurado por contribuir en la revisión de este trabajo.

<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
Estructura de la mitocondria	2
El efecto de las hormonas tiroideas sobre las funciones mitocondriales	2
Efectos, a corto plazo, de la hormona tiroidea sobre las funciones celulares	4
1. Sitios de unión en la membrana plasmática	4
2. Sitios de unión en el citosol	5
3. Sitios de unión en el núcleo	5
4. Sitios de unión en la mitocondria	6
Efectos, a largo plazo, de la hormona tiroidea sobre las funciones celulares	6
Funciones del calcio intracelular	9
Mecanismos de transporte de calcio en la mitocondria	9
Uniportador de $\text{Ca}^{2+}$	11
Intercambiador de $2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$	12
Intercambiador de $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$	13
Transición de la permeabilidad mitocondrial	13
<b>HIPÓTESIS</b>	15
<b>OBJETIVOS</b>	15
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Material biológico	16
Medio básico	16
Aislamiento de las mitocondrias	17

Medida del control respiratorio	17
Síntesis del rutenio 360 ( $\text{Ru}_{360}$ y $^{103}\text{Ru}_{360}$ )	18
Transporte de Calcio	18
Inhibición del transporte de Calcio	19
Unión del $^{103}\text{Ru}_{360}$	19
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	20
<b>RESULTADOS</b>	21
<b>DISCUSIÓN</b>	31
<b>CONCLUSIÓN</b>	36
<b>REFERENCIAS</b>	37

## RESUMEN

La hormona tiroidea ( $T_3$ ) regula la expresión génica de diferentes proteínas de la membrana interna mitocondrial. Algunas de ellas actúan como transportadoras de electrones y otras como transportadoras de metabolitos. En este trabajo exploramos la posibilidad de que la biosíntesis del uniportador de  $Ca^{2+}$  de la membrana interna mitocondrial pudiera ser regulada por la hormona tiroidea. La conclusión de este trabajo es que, la expresión de este uniportador es modulada por dicha hormona. Esta conclusión tiene como fundamento los resultados obtenidos, utilizando mitocondrias de hígado de ratas controles, hipotiroideas, hipotiroideas tratadas con la hormona tiroidea (hipotiroideas+ $T_3$ ) e hipertiroideas, se obtuvo un mayor transporte de  $Ca^{2+}$  en el estado hipertiroideo, igual transporte en el estado hipotiroideo+ $T_3$  y uno menor en el hipotiroideo con relación al control. Por otro lado, se observó que se necesitó de una menor concentración del inhibidor rutenio 360 ( $Ru_{360}$ ) para eliminar en un 85 % el transporte de calcio en el estado hipotiroideo y una mayor concentración de éste para eliminar dicho transporte en el estado hipertiroideo, con respecto al control y lo más importante, cuando se administró la hormona  $T_3$  a las ratas hipotiroideas el porcentaje de inhibición fue similar al del control. Así mismo, la unión del inhibidor radiactivo rutenio 360 ( $^{103}Ru_{360}$ ) al uniportador de calcio, fue mayor en las mitocondrias de las ratas hipertiroideas ( $42.9 \pm 3.3$  pmol/mg de proteína), menor en las hipotiroideas ( $26.7 \pm 2.4$  pmol/mg de proteína) e igual en las hipotiroideas+ $T_3$  ( $34.9 \pm 4.6$  pmol/mg de proteína) con respecto a las controles ( $33.7 \pm 2.6$  pmol/mg de proteína). Cabe mencionar que no se observaron diferencias en las constantes de disociación del  $^{103}Ru_{360}$ . El aumento tanto en el transporte de  $Ca^{2+}$  como en la unión del  $^{103}Ru_{360}$  en las mitocondrias de las ratas hipertiroideas se normalizó con la administración de cicloheximida un inhibidor de la síntesis de proteínas.

## INTRODUCCIÓN

### Estructura de la mitocondria

La fosforilación oxidativa es responsable de la producción del 95% de la energía en forma de ATP y se lleva a cabo dentro de la mitocondria (Voet y Voet, 1995). La mitocondria es un compartimento intracelular en las células con metabolismo aeróbico; tiene un diámetro de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  y una longitud aproximada de 1.5 a 2  $\mu\text{m}$ . Está formada por dos membranas unitarias que se encuentran separadas por un espacio intermembranal. Mientras la membrana externa es lisa y continúa alrededor de la mitocondria, la membrana interna forma extensos plegamientos irregulares llamados crestas en los cuales se encuentran embebidas las enzimas que integran la cadena transportadora de electrones, la adenin nucleótido translocasa y la  $F_1$ -ATPasa. Contendida por la membrana interna se encuentra la matriz mitocondrial (Whittaker, 1978), en la cual se encuentran las enzimas del ciclo de Krebs y de la  $\beta$ -oxidación, el DNA y ribosomas.

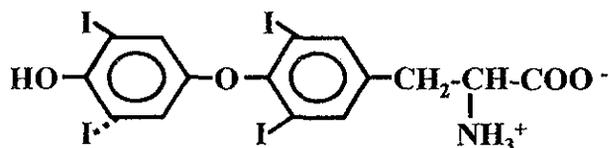
### El efecto de las hormonas tiroideas sobre las funciones mitocondriales

La glándula tiroides produce dos hormonas: la L-tiroxina ( $T_4$ ) y la 3,3',5-triiodo-L-tironina ( $T_3$ ) (Figura 1). Estas hormonas ejercen una acción importante sobre numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos en la célula, que comprenden desde la regulación del crecimiento y diferenciación celular hasta la regulación del metabolismo energético (Goglia *et al.* 1999). Por ejemplo, el incremento en los niveles de estas hormonas tiene como consecuencia la estimulación de la actividad respiratoria de la mitocondria. A este respecto, en años recientes se ha postulado que la  $T_3$  regula la respiración de una manera rápida por

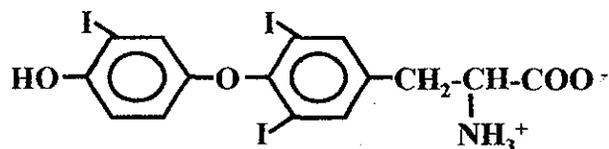
interactuar en forma directa con diferentes componentes de la cadena respiratoria, y de una manera más lenta estimulando la expresión de genes que codifican para componentes de la cadena respiratoria (Soboll, 1993). La hormona  $T_3$  además induce cambios en la eficiencia del acoplamiento entre el transporte de los electrones y la síntesis del ATP, debido a cambios en la permeabilidad específica de la membrana interna mitocondrial (Brand *et al.* 1994; Harper, 1993).

La acción de las hormonas tiroideas se manifiesta especialmente en el hígado, el corazón, el riñón y el cerebro. Esta acción es extremadamente compleja, ya que, como se mencionó, pueden influir de dos maneras sobre las funciones celulares, i.e., a corto plazo uniéndose extranuclearmente a proteínas, y a largo plazo, sobre la expresión genética, vía receptores nucleares y mitocondriales.

A)



B)



**Figura 1. Estructura química de las hormonas tiroideas. A) L-tiroxina o  $T_4$ ; B) 3,3',5-triiodo-L-tironina o  $T_3$**

## **Efectos, a corto plazo, de la hormona tiroidea sobre las funciones celulares**

El primer paso en la ruta de acción de las hormonas tiroideas es su unión a receptores celulares localizados en la membrana plasmática, en la mitocondria, en el núcleo, o a proteínas citoplásmicas.

### **1. Sitios de unión en la membrana plasmática**

Los receptores de la membrana plasmática son proteínas que pesan de 30 a 70 kDa y han sido identificadas en el hígado, el riñón, los timocitos y los eritrocitos de la rata (Dozin *et al.* 1985; Pliam y Goldfine, 1977; Gharbi-Chihi y Terresani, 1981; Segal e Ingbar, 1982; Botta *et al.* 1983; Angel *et al.* 1990), en los fibroblastos del ratón (Cheng, 1983) y en el hígado del bovino (Horiuchi *et al.* 1989).

También se conoce la existencia de una entrada saturable de la hormona tiroidea mediada por un acarreador. Este sistema de transporte exhibe sitios de alta y baja afinidad con valores de  $K_m$  de 21-61 nM y de 646 a 2800 nM, respectivamente y ha sido identificado en los fibroblastos del ratón (Cheng, 1983), en los hepatocitos, en los adipositos y en los eritrocitos de la rata (Landeta *et al.* 1987; Krenning *et al.* 1981; Osty *et al.* 1988). Sin embargo, Samson en 1992 observó en los eritrocitos de rata que la hormona  $T_3$  se unía y penetraba al interior de la célula a través del transportador de triptofano, por lo que, también se ha postulado que esta hormona se transporta a través de la membrana plasmática utilizando los acarreadores de aminoácidos.

## 2. Sitios de unión en el citosol

Tanto la  $T_3$  como la  $T_4$  pueden unirse a diferentes proteínas citosólicas en el hígado, el corazón, el cerebro y el riñón. Por ejemplo en el hígado y el riñón de la rata se han encontrado proteínas citosólicas de 26 a 70 kDa (Dozin *et al.* 1985) que cuando se unen a la  $T_3$  la activan. Una de ellas es activada por NADPH y se une fuertemente a la membrana interna mitocondrial como un complejo proteína- $T_3$ . Esta proteína tiene un peso molecular de 58 kDa y una alta afinidad por la L y D-  $T_3$  (con una constante de asociación ( $K_a$ ) de  $2.4 \text{ nM}^{-1}$ ) (Hashizume *et al.* 1989). La otra proteína no requiere de la presencia del NADPH, es un dímero de 76 kDa (38 kDa cada una). La concentración de proteínas citosólicas que se unen a las hormonas tiroideas está relacionada con el estadio de desarrollo del tejido (Susuki *et al.* 1991).

La función de estas proteínas puede ser la de un reservorio y un sistema de transporte intracelular de las hormonas hacia la mitocondria y el núcleo (Ichikawa y Hashizume, 1991).

## 3. Sitios de unión en el núcleo

En el núcleo existe un receptor para la hormona tiroidea, con una masa molecular de 47-57 kDa. Es una proteína ácida no histónica que se une a la cromatina, al ADN y a la histona. Se encuentra preferencialmente en la cromatina transcripcionalmente activa. Pertenece a la familia de receptores c-erb A y su estructura es altamente conservada en diversas especies. Es muy abundante en la glándula pituitaria, seguida del hígado, del riñón, del corazón, del cerebro y de los testículos de la rata (Soboll, 1993)

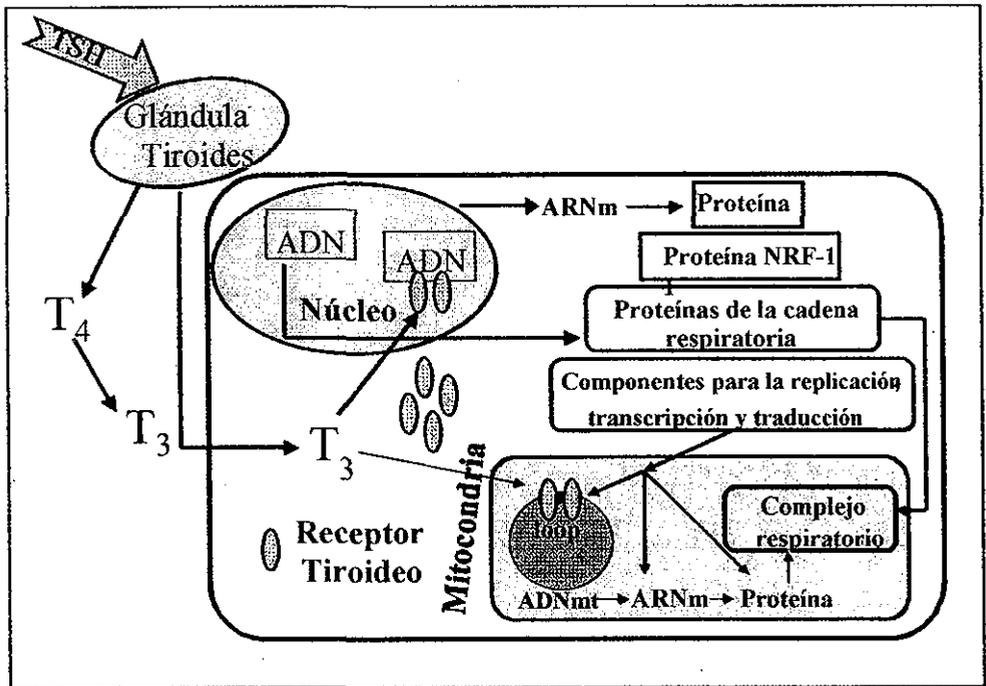
#### 4. Sitios de unión en la mitocondria

En la mitocondria de hígado la hormona tiroidea se une a dos proteínas una de alto peso molecular (43 kDa) localizada en la matriz y una de bajo peso molecular (28 kDa) localizada en la membrana interna (Sterling y Milch, 1984); sin embargo, actualmente no se conocen sus funciones.

Por otro lado también se han identificado sitios de unión de la  $T_3$  en la membrana externa mitocondrial ( $K_a$  de  $0.5 \text{ nM}^{-1}$ ) (Hashizume *et al.* 1984). Dicha unión es inhibida *in vitro* por el calcio ( $K_i$   $75 \text{ } \mu\text{M}$ ), el cual libera al receptor de la membrana externa.

#### Efectos, a largo plazo, de la hormona tiroidea sobre las funciones celulares

El siguiente paso en la en la ruta de acción de las hormonas tiroideas es su efecto sobre la expresión genética. Al respecto, en los últimos años se ha demostrado que la  $T_3$  puede ejercer este efecto a través de un receptor nuclear (TR) (Figura 2). Este receptor se asocia íntimamente a la cromatina y a la hormona tiroidea con una alta afinidad y especificidad (Goglia *et al.* 1999). Los TR son factores de transcripción que se mantienen unidos a sitios específicos del ADN, conocidos como elementos de respuesta a la hormona tiroidea (TREs). En ausencia de la hormona, el receptor TR tiene una función represora intrínseca de la transcripción.



**Figura 2. Influencia de la hormona  $T_3$  sobre la síntesis de las proteínas.** La glándula tiroides una vez estimulada por la hormona estimulante de la tiroides (TSH) produce L-tiroxina ( $T_4$ ) y triiodo-L-tironina ( $T_3$ ). La  $T_4$  se convierte en  $T_3$  y de esta manera ejerce su efecto. La  $T_3$  estimula la transcripción por su unión a un receptor tiroideo que interactúa con secuencias específicas del ADN nuclear (ADN) o mitocondrial (ADNmt), conocidas como elementos de respuesta a la hormona tiroidea (TREs). Así la  $T_3$  puede desencadenar una cascada de expresión, que además de estimular la síntesis de proteínas que integran el complejo respiratorio mitocondrial, estimula la síntesis de factores de replicación, transcripción y traducción, que promueven la síntesis de otras proteínas.

Se conoce que la hormona  $T_3$  activa la expresión de nueve genes nucleares que codifican proteínas del aparato respiratorio; dicho efecto es mediado por la interacción directa del complejo  $T_3$ -TR con los elementos de respuesta a la hormona tiroidea (Pillar y Seitz, 1997; Scarpulla, 1996). En mitocondrias, la hormona tiroidea regula la velocidad de síntesis del ARN de 2 a 8 veces en 1 a 3 días, lo que está de acuerdo con el aumento de la cantidad de proteína sintetizada (Mutvei *et al.* 1989). Dicha regulación se debe a la activación de la expresión de un factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA) (Garstka *et al.* 1994; Virbasius y Scarpulla, 1994) o a la interacción directa de la  $T_3$  con receptores mitocondriales específicos (**Figura 2**) (Wrutniac *et al.* 1995; Wrutniac y Cabello, 1996). A este respecto se ha demostrado que después de un tratamiento con la hormona tiroidea existe un incremento en la concentración de la subunidad IV de la citocromo oxidasa (Weisner *et al.* 1992), de algunas subunidades del complejo citocromo  $bc_1$  (Joste *et al.* 1989) y de la subunidad- $\beta$  de la  $F_1$ -ATPasa (Izquierdo *et al.* 1995). Con respecto a la influencia de esta hormona sobre sistemas de transporte mitocondriales, se conoce que regula la biogénesis de la adenin nucleótido translocasa (Schönfeld *et al.* 1997), de la proteína desacoplante (Larkin *et al.* 1997) y del acarreador de tricarbóxilatos (Paradies y Rigguiero, 1990).

Debe hacerse notar que el tratamiento con hormona tiroidea incrementa el ciclo de entrada y salida de calcio de la mitocondria, el cual depende de una alta actividad del uniportador de calcio (Imberti *et al.* 1994). Es por ello que en este trabajo se exploró la posibilidad de que la hormona tiroidea regule la síntesis del uniportador de calcio.

## **Funciones del calcio intracelular**

Cambios en la concentración citosólica del calcio libre regulan los sistemas celulares como: la contracción muscular, la secreción y la ruptura del glucógeno regulada hormonalmente (Carafoli, 1987; Rasmussen y Barrett, 1984).

Por otro lado existen muchos reportes acerca de la activación que ejerce el calcio sobre algunas enzimas mitocondriales del ciclo de Krebs como la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa, así como la piruvato deshidrogenasa (Denton y McCormack, 1990, Hansford, 1994), el transporte de electrones (Halestrap, 1987), la adenín nucleótido translocasa (Moreno-Sánchez, 1985) y la  $F_1$ -ATPasa (Yamada y Huzel, 1989). A nivel del citosol, concentraciones micromolares de  $Ca^{2+}$  alteran la estructura de ciertas proteínas y de los ácidos nucleicos (Farber, 1990). A más bajas concentraciones, puede interferir en el control de cinasas que requieren  $ATP-Mg^{2+}$  (Blackshear *et al.* 1988) y activar a las fosfolipasas o proteasas dependientes de calcio.

## **Mecanismos de transporte de calcio en la mitocondria**

Hasta hace poco se consideraba que las mitocondrias acumulaban  $Ca^{2+}$  para disminuir la concentración de  $Ca^{2+}$  en el citosol en respuesta a las variaciones de este ion dentro de la célula (Akerman y Nicholls, 1983) y de esta manera proteger al citosol contra la hipercalcemia que se presenta en condiciones patológicas. Actualmente se considera que el papel principal del transporte de calcio mitocondrial es secuestrar al  $Ca^{2+}$  citosólico para activar los procesos metabólicos mitocondriales dependientes de este ion.

La mitocondria posee un elaborado sistema de transporte de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana interna mitocondrial. La acumulación de calcio es un fenómeno dependiente de

energía, ya sea por la hidrólisis de ATP o por la oxidación de un sustrato a través de la cadena respiratoria. En ambas condiciones se genera un potencial de membrana interno negativo (aproximadamente 140 mV) que favorece la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Carafoli, 1975, Akerman y Nicholls, 1983). La capacidad de la mitocondria para acumular calcio dentro de la matriz puede exceder a 1 M y la afinidad para captarlo es suficiente para reducir el calcio externo libre a 1  $\mu\text{M}$ .

Se conoce que son cuatro los mecanismos por los que el calcio se transporta y estan localizados en la membrana interna mitocondrial. El primero es la entrada de calcio a la matriz mitocondrial a través del uniportador, otros dos son intercambiadores y funcionan como mecanismos de salida, uno dependiente del  $\text{Na}^+$  y el otro dependiente del  $\text{H}^+$ . Por último, otro que se relaciona con un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, que permite la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  y otros solutos (Gunter y Pfeiffer, 1990; Gunter y Gunter, 1994).

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial es menor que en el citosol, por lo que el flujo de entrada es energéticamente favorable, mientras que su salida requiere de energía. El uniportador (U) de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial facilita el transporte de este ion a favor de un gradiente electroquímico. El mecanismo de salida dependiente del  $\text{Na}^+$ , actúa intercambiando una molécula de  $\text{Ca}^{2+}$  por dos moléculas de  $\text{Na}^+$ . Así mismo el mecanismo de salida dependiente del  $\text{H}^+$  intercambia activamente una molécula  $\text{Ca}^{2+}$  por dos moléculas de  $\text{H}^+$ , usando el gradiente químico del  $\text{H}^+$  como fuerza impulsora (Gunter, 1994).

### Uniportador de $\text{Ca}^{2+}$

Como se apuntó anteriormente, el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  permite la entrada de este ion en respuesta al establecimiento de un potencial de membrana, requiere de la oxidación de un sustrato o la hidrólisis de ATP y algunas veces puede actuar de manera inversa (bidireccionalmente) (Figura 3).

El uniportador transporta de 700 a 1200 nmol de  $\text{Ca}^{2+}$ / min/mg de proteína, en mitocondrias de hígado de rata (Vinogradov y Scarpa, 1973; Hutson *et al.* 1976; Bragadin *et al.* 1979); mientras que en mitocondrias de corazón transporta de 400 a 1170 nmol de  $\text{Ca}^{2+}$ / min/ mg de proteína (Vercesi *et al.* 1978; McMillin-Wood *et al.* 1980). Se ha reportado que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima oscila entre 1-190  $\mu\text{M}$  (Vinogradov y Scarpa, 1973; Crompton *et al.* 1976; Pfeiffer *et al.* 1976; Akerman, 1977b; Hutson, 1977).

El transporte de calcio sigue un comportamiento sigmoidal con respecto a la concentración del ion, con un coeficiente de Hill que varía entre 1.7 y 2 (Bygrave *et al.* 1971; Scarpa y Graziotti, 1973; Vinogradov y Scarpa, 1973; Reed y Bygrave, 1975; Heaton y Nicholls, 1976; Hutson *et al.* 1976; Bragadin *et al.* 1979), lo cual sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  se une al menos a dos sitios en el uniportador, que pueden ser ambos de transporte o bien, uno de ellos de transporte y otro de regulación. Sin embargo, otros autores, que no observan este fenómeno, sugieren que depende de la temperatura o de la fuerza iónica del medio, así como de la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  u otras condiciones (Akerman, 1977; Akerman, 1977b; Bragadin *et al.* 1979; Crompton, *et al.* 1976).

Los inhibidores del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden ser de cuatro tipos. Entre los inhibidores competitivos se encuentran los iones que también son transportados a través

del uniportador, como el  $\text{Sr}^{2+}$ , el  $\text{Mn}^{2+}$ , el  $\text{Ba}^{2+}$  el  $\text{Fe}^{2+}$  y los lantánidos. Existe otro grupo de inhibidores que está formado por cationes como el  $\text{Mg}^{2+}$ , las poliaminas, los protones, que a pesar de no ser transportados por el uniportador, interfieren en el proceso de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a su unión al uniportador o por un efecto de apantallamiento de cargas que ejercen sobre él. El tercer grupo de inhibidores lo componen los policationes como el rojo de rutenio y la hexamina de cobalto (Tashmukhamedov *et al.* 1972 ) que actúan de manera similar al  $\text{Mg}^{2+}$ . Dentro de este último grupo también se encuentra el rutenio 360 ( $\text{Ru}_{360}$ ) que inhibe de manera no competitiva al uniportador (Zazueta *et al.*, 1999). Finalmente, existen algunos fármacos como los  $\beta$ -bloqueadores ( Noak y Greeff, 1971), las guanidinas (Davidoff, 1974) y los diuréticos (Gemba, 1974) que actúan como inhibidores del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **Intercambiador de $2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$**

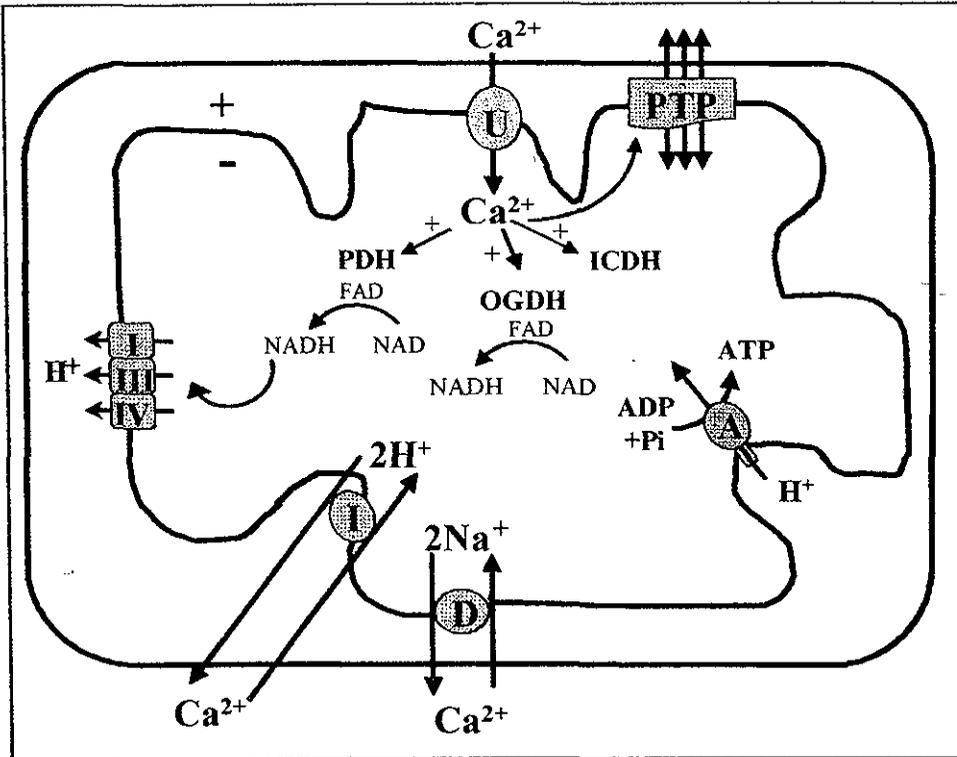
Este intercambiador permite la salida de una molécula de  $\text{Ca}^{2+}$  por cada dos moléculas de  $\text{H}^+$  que entran a la mitocondria, recibiendo parte de su energía de la cadena transportadora de electrones (Gunter *et al.* 1991) (**Figura 3**). Este mecanismo es completamente independiente del  $\text{Na}^+$  (Bernardi y Azzone, 1979; Gunter y Pfeiffer, 1990). Los parámetros cinéticos más altos reportados para este mecanismo son una  $V_m$  de 1.2 nmol/min/mg de proteína, una  $K_m$  de 8.4 nmol/mg de proteína (Wingrove y Gunter, 1986), en mitocondrias de hígado. La salida se inhibe con bajas concentraciones de desacoplantes (Bernardi y Azzone, 1982; Gunter y Pfeiffer, 1990); el  $\text{Mn}^{2+}$  (Gavin *et al.* 1990) y el  $\text{Sr}^{2+}$  (Gunter *et al.* 1988) lo inhiben competitivamente ya que son transportados por este mecanismo.

### **Intercambiador de $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$**

El intercambio de las moléculas del  $\text{Ca}^{2+}$  por las moléculas del  $\text{Na}^+$  es un mecanismo de salida de  $\text{Ca}^{2+}$  activo, con una estequiometría 1:2 ó 1:3 (Gunter y Gunter, 1994) (**Figura 3**). Wingrove y Gunter en 1986 determinaron los valores de  $V_m = 2.6$  nmol/min/mg de proteína,  $K_{m_{\text{Na}}} = 9.4$  mM y  $K_{m_{\text{Ca}}} = 8.1$  mM en las mitocondrias del hígado; este mecanismo es mucho más activo en las mitocondrias de los tejidos excitables como el corazón y el cerebro. La salida del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de este intercambiador, es activada por las poliaminas espermina y espermidina (Nicchitta y Williamson, 1984); es inhibida por el  $\text{Mg}^{2+}$ , por altas concentraciones del rojo de rutenio (Wingrove y Gunter, 1986) y por el verapamil un bloqueador de los canales de calcio (Wolkowicz *et al.* 1983).

### **Transición de la permeabilidad mitocondrial**

Existe un cuarto mecanismo de transporte conocido como transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM), que se caracteriza por la apertura de un poro transmembranal inespecífico (PTP), de aproximadamente 2-3 nm de diámetro, en la membrana interna mitocondrial (**Figura 3**) (Hunter *et al.* 1976), que permite el paso de diversos iones y moléculas de hasta 1.5 kDa (Bernardi *et al.* 1994). Aunque Igbavboa *et al.* (1989) y Chávez *et al.* (1992) reportaron la salida de moléculas mayores. Este dramático incremento en la permeabilidad ocurre después de la acumulación masiva de calcio y de la adición de un agente inductor como el carboxiatractylosido, el fosfato, etc (Zoratti y Szabó, 1995). Este mecanismo de transporte se inhibe con el ADP, el bongkretato, la albumina sérica de bovino (Gunter y Pfeiffer, 1990). Así la transición de la permeabilidad mitocondrial es considerada como una forma de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha sugerido que opera en condiciones patológicas (Gunter y Pfeiffer, 1990; Richter, 1993), en la muerte celular programada o apoptosis (Kroemer *et al.* 1997; Qian *et al.* 1997).



**Figura 3. Transporte de calcio en la mitocondria.** El  $\text{Ca}^{2+}$  entra a la mitocondria electroforéticamente a través del uniprotector de calcio mitocondrial (U) en respuesta al potencial de membrana generado por el bombeo de protones de la cadena respiratoria (I, III, IV), dichos protones son utilizados de igual manera por la ATP sintetasa (A) para la síntesis ATP. El  $\text{Ca}^{2+}$  sale en intercambio con  $2\text{H}^+$  o  $2\text{Na}^+$  a través de sus acarreadores específicos (I o D, respectivamente) o a través del poro de la transición de la permeabilidad (PTP). Dentro de la matriz mitocondrial la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  regula la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs, i.e. oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH), la piruvato deshidrogenasa (PDH) y la isocitrato deshidrogenasa (ICDH).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **HIPÓTESIS**

De acuerdo a los antecedentes, que demuestran que la hormona tiroidea induce la expresión de proteínas mitocondriales, en este trabajo trataremos de demostrar que la síntesis del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  es inducida por la hormona tiroidea.

## **OBJETIVOS**

### **a) Generales**

1. Conocer si la hormona tiroidea (triiodotironina o  $\text{T}_3$ ) regula la síntesis del uniportador de calcio mitocondrial.

### **b) Particulares**

1. Determinar los parámetros cinéticos del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias de las ratas controles, hipotiroideas, hipotiroideas tratadas con  $\text{T}_3$  (hipotiroideas+ $\text{T}_3$ ) e hipertiroideas.
2. Determinar las constantes de inhibición del transporte de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias de las ratas controles, hipotiroideas, hipotiroideas+ $\text{T}_3$  e hipertiroideas utilizando el rutenio 360 ( $\text{Ru}_{360}$ ).
3. Conocer si en las mitocondrias de las ratas hipertiroideas existe una mayor concentración del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  y si las mitocondrias de las ratas hipotiroideas+ $\text{T}_3$  tienen la misma concentración de uniportador que las mitocondrias de las ratas controles, utilizando  $^{103}\text{Ru}_{360}$  para titularlo.
4. En caso de que existiera un efecto de la hormona  $\text{T}_3$  sobre la síntesis del uniportador, utilizar a la cicloheximida como un inhibidor de la síntesis de proteínas para revertir su efecto.

## **HIPÓTESIS**

De acuerdo a los antecedentes, que demuestran que la hormona tiroidea induce la expresión de proteínas mitocondriales, en este trabajo trataremos de demostrar que la síntesis del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  es inducida por la hormona tiroidea.

## **OBJETIVOS**

### **a) Generales**

1. Conocer si la hormona tiroidea (triiodotironina o  $\text{T}_3$ ) regula la síntesis del uniportador de calcio mitocondrial.

### **b) Particulares**

1. Determinar los parámetros cinéticos del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias de las ratas controles, hipotiroideas, hipotiroideas tratadas con  $\text{T}_3$  (hipotiroideas+ $\text{T}_3$ ) e hipertiroideas.
2. Determinar las constantes de inhibición del transporte de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias de las ratas controles, hipotiroideas, hipotiroideas+ $\text{T}_3$  e hipertiroideas utilizando el rutenio 360 ( $\text{Ru}_{360}$ ).
3. Conocer si en las mitocondrias de las ratas hipertiroideas existe una mayor concentración del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  y si las mitocondrias de las ratas hipotiroideas+ $\text{T}_3$  tienen la misma concentración de uniportador que las mitocondrias de las ratas controles, utilizando  $^{103}\text{Ru}_{360}$  para titularlo.
4. En caso de que existiera un efecto de la hormona  $\text{T}_3$  sobre la síntesis del uniportador, utilizar a la cicloheximida como un inhibidor de la síntesis de proteínas para revertir su efecto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Se utilizaron ratas hembras Wistar de 300 g de peso con alimentación *ad libitum*.

Para la obtención de las ratas hipertiroideas se administró 3,5,3'-triiodotironina (2 mg/Kg de peso) por un periodo de 5 días, vía intraperitoneal (Joste *et al.* 1989; Schönfeld *et al.* 1997, Bobadilla *et al.* 2001).

El hipotiroidismo se indujo en las ratas utilizando el método descrito por Paniagua *et al.* 1992, mediante el cual una vez que se anestesió a la rata, se expuso a la traquea y utilizando un microscopio estereoscópico se localizaron a las glándulas paratiroides, se disecaron de la glándula tiroides, se removió totalmente la glándula tiroides y las glándulas paratiroides se reimplantaron nuevamente. El hipotiroidismo se comprobó por la medición de los niveles de la hormona tiroidea en la sangre, utilizando el método de radioinmunoensayo descrito por Paniagua *et al.* 1992. Para corroborar que no se hubieran modificado los niveles de calcio y fósforo en el suero por la cirugía, se midieron sus concentraciones utilizando la técnica espectrofotométrica descrita por Chávez *et al.* 1998. Tres meses después de la cirugía las ratas estaban hipotiroideas.

Las ratas hipotiroideas fueron tratadas con 3,5,3'-triiodotironina 8 mg/Kg de peso por dos semanas para revertir el efecto del hipotiroidismo.

### Medio básico

En la mayoría de los experimentos se empleó el siguiente medio: 125 mM de KCl, 10 mM de HEPES; 2 mM de Pi; 10 mM de succinato; 200  $\mu$ M de ADP; 10  $\mu$ g de rotenona en un volumen final de 1 mL, pH 7.3 (20 °C). Las adiciones y modificaciones a este medio, se especifican en las figuras y tablas correspondientes.

### **Aislamiento de las mitocondrias**

Se utilizó la técnica de centrifugación diferencial descrita por Chávez *et al.* 1985 para el aislamiento de las mitocondrias de hígado.

- 1) Se extrajo el tejido y se homogeneizó en un medio isotónico de sacarosa 0.25 M, TRIS 0.01 M y EDTA 0.001 M (pH 7.3).
- 2) Se centrifugó a  $2,450 \times g$  durante 10 min a  $4^\circ C$ .
- 3) Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a  $9,800 \times g$  por 10 min a  $4^\circ C$ .
- 4) El sedimento se resuspendió y se incubó por 10 min a  $4^\circ C$  en sacarosa 0.25 M, TRIS 0.01 M y albúmina sérica de bovino libre de ácidos grasos 0.2 %.
- 5) Se centrifugó nuevamente a  $9,800 \times g$  por 10 min a  $4^\circ C$  y se resuspendió el botón en el mismo medio sin albúmina.
- 6) Se determinó la concentración de proteínas por el método de biuret (Gornall *et al.* 1949); utilizando 10 mg/mL de albúmina de bovino como estándar.

### **Medida del control respiratorio**

El control respiratorio fue determinado polarográficamente utilizando un electrodo tipo Clark acoplado a un registrador. Las mediciones se hicieron en presencia de 0.66 mg de proteína mitocondrial en 2 mL de medio básico (sin ADP) y a  $25^\circ C$ . La estimulación de la respiración se hizo adicionando 10  $\mu L$  de ADP 60 mM. La concentración de oxígeno disuelto en la mezcla de incubación fue determinada considerando que hay 400 nAtomos de oxígeno/ mL , a  $25^\circ C$  y a la altura de la ciudad de México (2,240 m).

### Síntesis del rutenio 360 ( $\text{Ru}_{360}$ y $^{103}\text{Ru}_{360}$ )

La técnica de síntesis del rutenio 360 ( $\text{Ru}_{360}$ ) fue descrita por Ying *et al.* 1991.

- 1) Se Pesaron 2.5 mg de  $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y se disolvieron en 0.015 mL de HCl 6 N.
- 2) Se adicionaron 0.002 mL de etanol absoluto y se puso la reacción en baño María por 1 h a  $90^\circ\text{C}$ . Posteriormente se adicionaron 2 mL de amonio concentrado y se centrifugó a  $20,000 \times g$  por 5 min.
- 3) Se resuspendió el precipitado en 0.2 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  12 N y se incubó a  $90^\circ\text{C}$  por 20 min y posteriormente se incubó toda la noche a  $40^\circ\text{C}$  y se centrifugó nuevamente a  $20,000 \times g$  por 5 min.
- 4) Se pasó el botón a una columna de carboximetilcelulosa pre-equilibrada con formiato de amonio 0.2 M (pH 5.0) y se eluyó con un gradiente de 0.2 a 0.6 M de formiato de amonio (50 mL totales; pH 5.0).
- 5) Se recuperaron las fracciones y se hizo el espectro máximo de absorción a cada una de 360 a 600 nm, y se encontró un solo pico de absorción a 360 nm, es decir libre de contaminación.
- 6) Se calculó la concentración sabiendo que el coeficiente de extinción molar del  $\text{Ru}_{360}$  es  $2.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Para la obtención del  $^{103}\text{Ru}_{360}$ , se utilizó  $^{103}\text{RuCl}_3$  y la misma técnica de síntesis.

### Transporte de Calcio

La entrada de calcio se midió con la técnica de filtración en millipore utilizando concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , hasta  $200 \mu\text{M}$  de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (actividad específica 700 cpm/nmol) en 1 mL de medio básico. El diámetro del poro de los filtros fue de  $0.45 \mu\text{m}$ . El experimento se realizó de la siguiente manera: en el min 0 se adicionaron 0.66 mg de

proteína. Se filtraron 200  $\mu\text{L}$  de la muestra después de 10 s de incubación a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se adicionaron 10 mL de KCl 0.1 M para lavar. Se midió la radioactividad en el filtro en un contador de radiaciones beta.

### **Inhibición del transporte de calcio**

La inhibición del transporte de calcio se midió con la técnica de filtración en millipore y en 1 mL de medio básico. El diámetro del poro de los filtros fue de 0.45  $\mu\text{m}$ . Las adiciones se realizaron de la siguiente forma: al min 0 se adicionaron 0.66 mg de proteína y de 5 hasta 80 nM de  $\text{Ru}_{360}$ ; al min 1 se adicionó 150  $\mu\text{M}$  de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (actividad específica 700 cpm/nmol); después de 10 s de incubación a 25  $^{\circ}\text{C}$  se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  y se filtró. De igual manera se lavó y se midió en un contador de radiaciones beta.

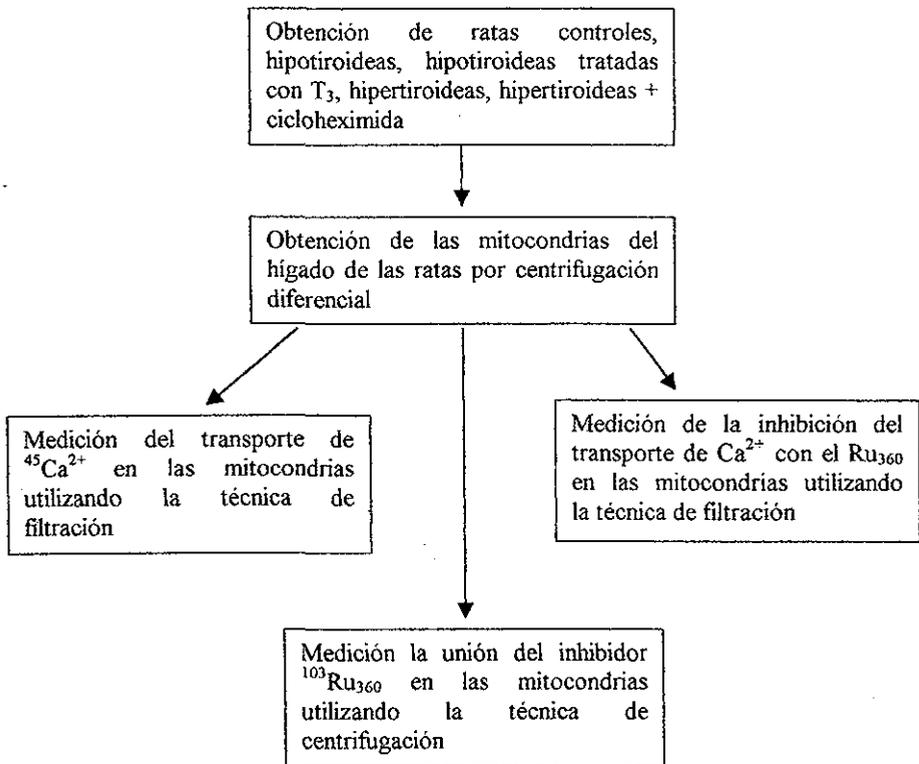
### **Unión del $^{103}\text{Ru}_{360}$**

Se utilizó la técnica de centrifugación descrita por Zazueta *et al.* 1999.

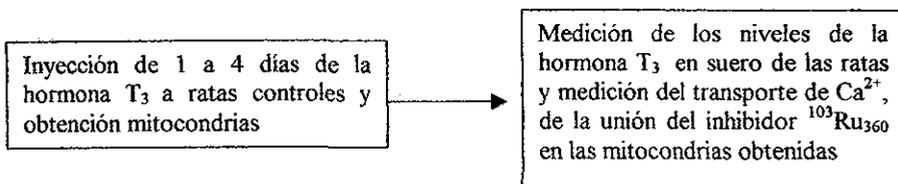
- 1) 1 mg de proteína mitocondrial se incubó a 25  $^{\circ}\text{C}$  con 5-70 nM  $^{103}\text{Ru}_{360}$  en 6 mL del medio básico sin la rotenona.
- 2) Se incubó durante 1 min y se centrifugó la muestra a 20,000  $\times$  g por 10 min y se descartó el sobrenadante.
- 3) El botón se resuspendió en 1 mL del mismo medio y se centrifugó nuevamente a 20,000  $\times$  g por 10 min.
- 4) El botón se resuspendió en 1 mL del mismo medio que contenía 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ru}_{360}$  frío, se incubó 1 min para eliminar la unión inespecífica del inhibidor.
- 5) Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y el botón se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de medio, se transfirió a un vial y se midió el contenido de radioactividad en un contador de radiaciones y.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### Influencia de la hormona $T_3$ sobre la síntesis del uniportador de $Ca^{2+}$



### Determinación del tiempo de síntesis del uniportador de $Ca^{2+}$



## RESULTADOS

Para conocer si la hormona tiroidea regula la síntesis del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, lo primero que se hizo, una vez que se indujeron los diferentes estados tiroideos en las ratas (hipotiroideo, hipertiroideo, hipotiroideo+ $\text{T}_3$ ), fue medir los niveles de la hormona triiodotironina ( $\text{T}_3$ ) en el suero, observándose que los niveles de  $\text{T}_3$  fueron hasta cinco veces mayores en las ratas hipertiroideas con respecto a las controles ( $5.44 \pm 0.37$  v.s.  $1.55 \pm 0.23$   $\mu\text{g}/100$  mL de suero) y mucho menores en las hipotiroideas con respecto a las controles ( $0.05 \pm 0.01$  v.s.  $1.55 \pm 0.23$   $\mu\text{g}/100$  mL de suero) (**Tabla 1**); dichos valores concuerdan con los reportados en la literatura (Schönfeld *et al.*, 1997). Debido a que existen diversos trabajos acerca del efecto de la hormona tiroidea sobre la respiración mitocondrial (Soboll, 1993; Pillar y Seitz, 1997), decidimos medir el consumo de oxígeno en las preparaciones mitocondriales de hígado, obtenidas a partir de los diferentes tipos de ratas (**Tabla 2**) y pudimos observar que el estado tiroideo no afectó significativamente la velocidad de consumo de oxígeno tanto en el estado 3 como en el estado 4 de la respiración en las mitocondrias de las ratas controles, hipertiroideas e hipotiroideas+ $\text{T}_3$ . Sin embargo, cabe mencionar que solamente hubo diferencia significativa en el consumo de oxígeno en ambos estados de las mitocondrias hipotiroideas con respecto a las controles (aproximadamente un 35% menos). Esto podría deberse a que la actividad de la enzima citocromo oxidasa está disminuida en dichas mitocondrias (Paradies *et al.* 1993). Por otro lado cabe mencionar que el control respiratorio no cambió en las mitocondrias de las ratas hipotiroideas con respecto a las controles ( $3.9 \pm 1.0$ , v.s.  $3.5 \pm 0.6$  ngAO/min/mg de proteína), pero disminuyó en las mitocondrias de las ratas hipertiroideas ( $2.4 \pm 0.3$  ngAO/min/mg de proteína). También se observaron cambios fenotípicos en cada una de las

ratas que indicaron hipo e hipertiroidismo, como son: el aumento de peso (hasta 100 g), mayor cantidad de tejido adiposo, pelo crespo, en el caso de las ratas hipotiroideas y lo contrario en las hipertiroideas.

**Tabla 1. Determinación de los niveles de la hormona tiroidea en suero.** Se utilizó un radioinmunoensayo (RIA); los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar. \* Valores con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (prueba de t de student;  $p < 0.05$ ).  $n=5$ .

Rata	Niveles de $T_3$ en suero $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$
Control	$1.55 \pm 0.23$
Hipotiroidea	$0.05 \pm 0.01$ *
Hipotiroidea + $T_3$	$4.26 \pm 0.29$ *
Hipertiroidea	$5.44 \pm 0.37$ *

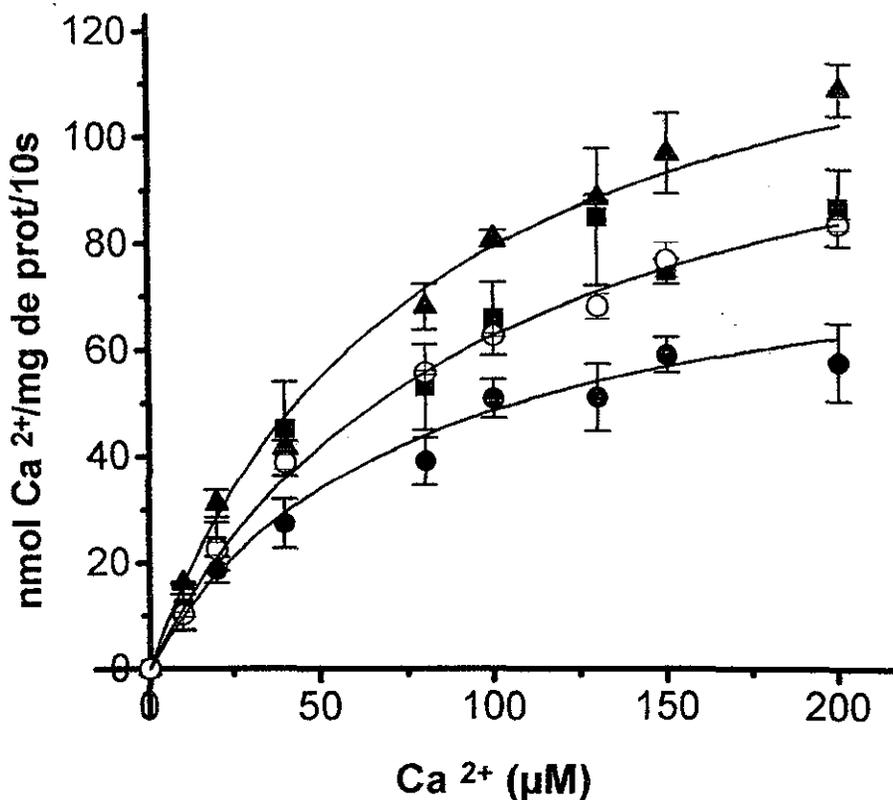
**Tabla 2. Determinación del control respiratorio.** Se utilizó un electrodo tipo Clark y el medio básico con la adición de 600 nmoles de ADP; los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar. \* Valores con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (prueba de t de student;  $p < 0.05$ ).  $n=10$ . \*\*  $n= 5$ .

Mitocondrias de la rata	ADP/O	Respiración Estado 3 $\text{ngAO}/\text{min}/\text{mg}$ de prot.	Respiración Estado 4 $\text{ngAO}/\text{min}/\text{mg}$ de prot.	Control respiratorio
Control	$1.6 \pm 0.3$	$131.8 \pm 18.5$	$45.3 \pm 12.8$	$3.5 \pm 0.6$
Hipotiroidea	$1.5 \pm 0.1$	$88.9 \pm 13.7$ *	$27.5 \pm 6.1$ *	$3.9 \pm 1.0$
** Hipotiroidea + $T_3$	$1.3 \pm 0.3$	$130.5 \pm 20.4$	$43.6 \pm 11.3$	$2.8 \pm 0.4$ *
Hipertiroidea	$1.4 \pm 0.2$	$154.4 \pm 46.1$	$62.9 \pm 9.3$	$2.4 \pm 0.3$ *

Se sabe que la hormona tiroidea tiene influencia sobre las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Greif, 1988), por lo cual se analizó el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias de las ratas con diferentes estados tiroideos y se observó una disminución del 20% en las mitocondrias de ratas hipotiroideas y un aumento aproximado del 18% en las mitocondrias de las ratas hipertiroideas con respecto a las controles; así mismo, el transporte en las mitocondrias de las ratas hipotiroideas+ $\text{T}_3$  fue igual que en las controles. (Figura 4, Tabla 3). Lo anterior puede indicar una mayor concentración de uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias de las ratas hipertiroideas, y una menor concentración del uniportador en las mitocondrias de las ratas hipotiroideas e igual concentración en las hipotiroideas+ $\text{T}_3$ .

**Tabla 3. Determinación de las constantes cinéticas del transporte de calcio.** Se utilizaron los datos de la Figura 4 y la ecuación  $v = (V_m \times S) / (K_s + S)$  en el programa Microcal Origin 3.3; los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar. \* Valores con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (prueba de t de student;  $p < 0.05$ ).  $n = 5$ .

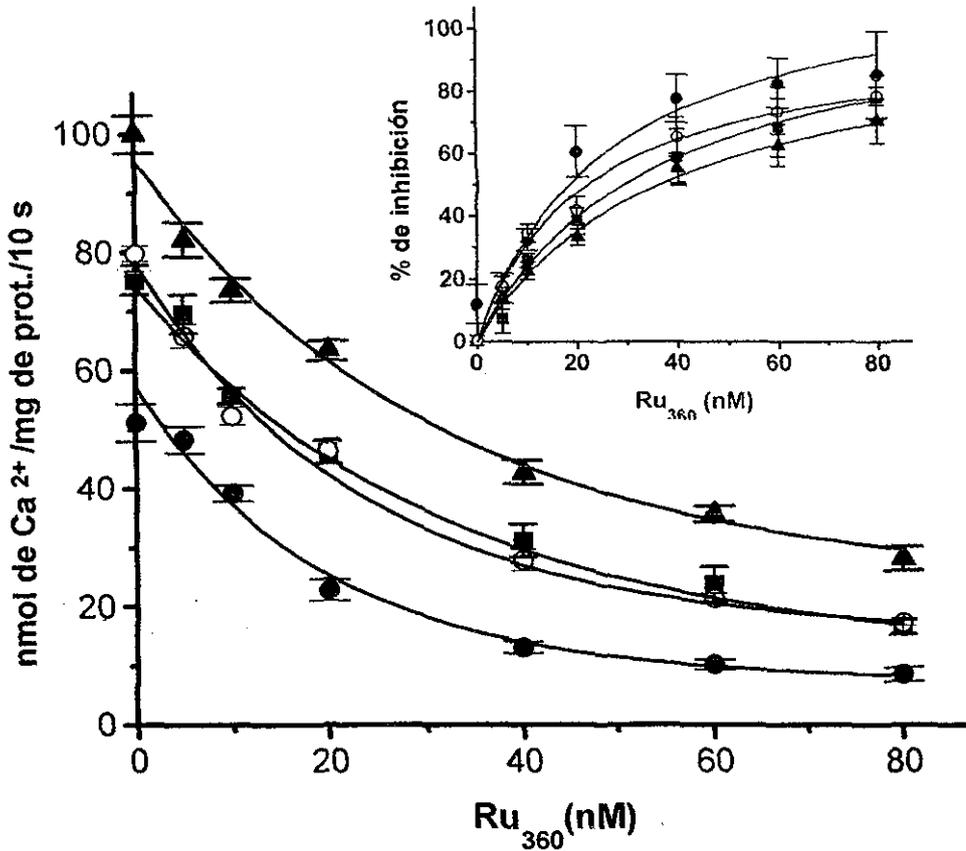
Mitocondria de la rata	$V_m$ (nmol de $\text{Ca}^{2+}$ /mg de prot./10 s)	$K_s$ ( $\mu\text{M}$ )
Control	116.8 $\pm$ 8.0	81.6 $\pm$ 14.6
Hipotiroidea	88.9 $\pm$ 13.7 *	77.2 $\pm$ 12.8
Hipotiroidea + $\text{T}_3$	125.8 $\pm$ 4.8	100.6 $\pm$ 7.5
Hipertiroidea	143.6 $\pm$ 4.5 *	80.8 $\pm$ 4.8



**Figura 4. Captación de calcio en presencia de diferentes concentraciones del catión.** La captación se inició agregando a 1 mL de medio 0.66 mg de proteína mitocondrial de hígado de rata control ■; hipotiroidea ●; hipertiroides ▲ e hipotiroidea inyectada con T<sub>3</sub> ○. El medio (medio básico) contenía 125 mM de KCl; 10 mM de HEPES; 2 mM de Pi; 10 mM de succinato; 200 μM de ADP; 10 μg de rotenona y de 10-200 μM de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> (actividad específica 700 cpm/nmol). Después de 10 s de incubación a 25 °C se filtraron alícuotas de 200 μL a través de filtros de 0.45 μm. Los valores representan la media ± la desviación estándar. n=5.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para confirmar lo anterior se analizó la inhibición del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando el inhibidor  $\text{Ru}_{360}$ . Se observó que en ausencia del inhibidor las mitocondrias de las ratas hipotiroideas transportan una menor concentración  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto a las controles, que dicho efecto se revierte al tratarlas con la  $\text{T}_3$  y que puede alcanzar valores mayores cuando se induce el hipertiroidismo (**Figura 5 y Tabla 4**). También se puede notar que se requiere una menor concentración del inhibidor para impedir casi por completo la entrada de calcio a las mitocondrias de las ratas hipotiroideas con respecto a las controles y que es necesario una mayor concentración del inhibidor para impedir dicho transporte en las mitocondrias hipertiroides. Los resultados anteriores nos indican que el número de moléculas de uniportador es diferente en cada tipo de mitocondria y lo más importante, que este número de moléculas depende del estado tiroideo. También se expresó dicha inhibición en porcentaje de inhibición (inserto de la **Figura 5**) y se observó que no existió diferencia significativa en el grado de inhibición del transporte.



**Figura 5. Inhibición de la captación de Ca<sup>2+</sup> con diferentes concentraciones de Ru<sub>360</sub>.** El experimento se inició incubando en el medio básico, por 1 min a 25 °C, concentraciones crecientes de Ru<sub>360</sub> con 0.66 mg de proteína mitocondrial de hígado de rata control ■; hipotiroidea ●; hipertiroidea ▲ e hipotiroidea inyectada con T<sub>3</sub> ○. Transcurrido ese tiempo se adicionaron 150 μM de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> (actividad específica 700 cpm/nmol) y se incubó 10 s. Se filtraron alícuotas de 200 μL a través de filtros de 0.45 μm. El inserto muestra los mismos datos pero expresados en porcentaje de inhibición de entrada de calcio. Los valores representan la media ± la desviación estándar. n= 5.

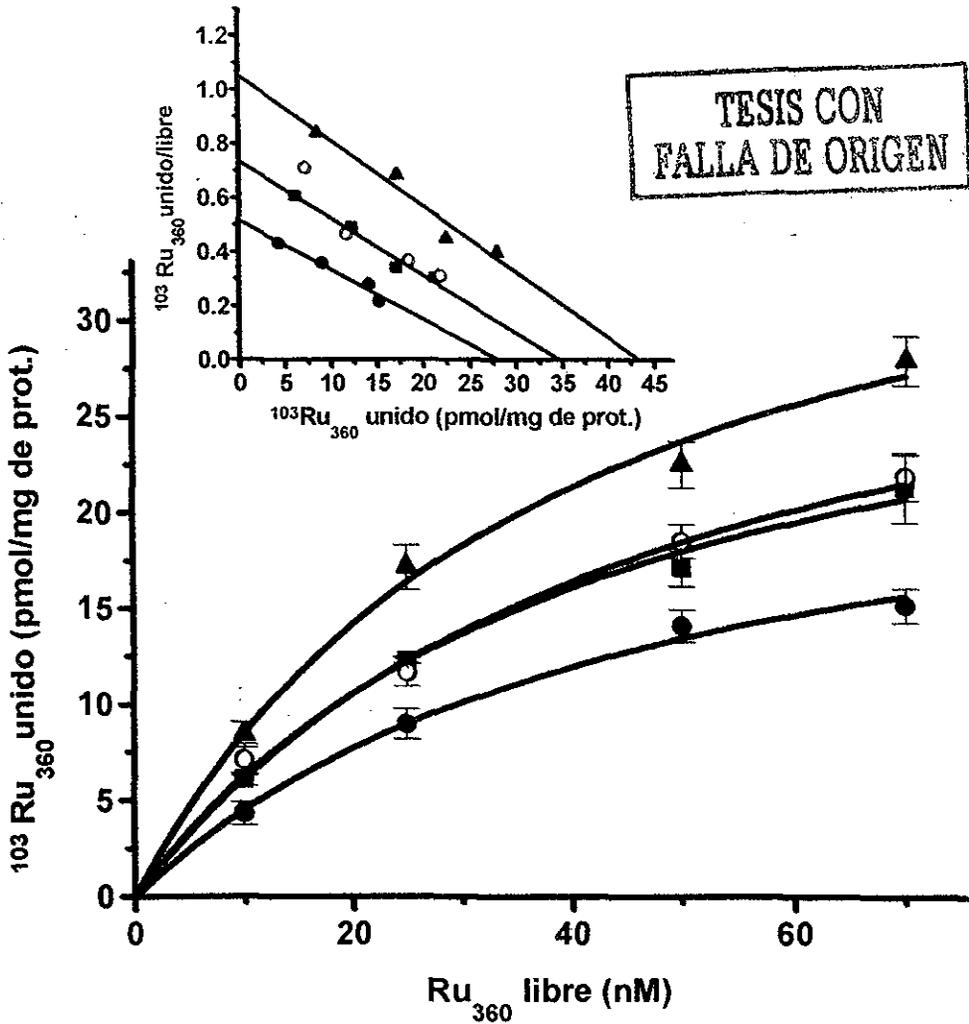
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 4. Determinación de las constantes de inhibición del transporte de calcio.**

Se utilizaron los datos de la figura 5 y la ecuación  $v = V_m * e^{-(I-I_0)/k}$  en el programa Microcal Origin 3.3; los valores representan la media.\* Valores con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (prueba de t de student;  $p < 0.05$ ).  $n = 5$ .

Mitocondria de la rata	$V_m$ (nmol de $Ca^{2+}$ /mg de prot./10 s)	k (nM)
Control	74.3	31.4
Hipotiroides	57.3 *	19.4 *
Hipotiroides + $T_3$	78.4	23.4
Hipertiroides	95.6 *	31

Para saber si existía diferente concentración del uniportador en cada tipo de mitocondria lo que se hizo fue medir la unión específica del inhibidor marcado radiactivamente ( $^{103}Ru_{360}$ ) utilizando la técnica de centrifugación. Los resultados se muestran en la **Figura 6** y la **Tabla 6**. Como se puede observar existió un incremento en la cantidad del uniportador en las mitocondrias de las ratas hipertiroides del 27 % y una disminución del 21% en las hipotiroides con respecto a las controles; pero lo más importante es que al inyectar a la rata hipotiroides con  $T_3$  el efecto se revirtió alcanzando valores similares al control (inserto de la **Figura 6**). Por otro lado al analizar los valores de la  $K_d$  en los diferentes tipos de mitocondrias pudimos observar que no existió diferencia significativa, lo cual nos indicó que el estado tiroideo no estaba afectando la afinidad de unión del inhibidor por el uniportador de calcio. Sino el número de acarreadores.



**Figura 6.** Unión del inhibidor radiactivo  $\text{Ru}_{360}$  a los diferentes tipos de mitocondrias. 0.66 mg de proteína mitocondrial de hígado de rata control ■; hipotiroidea ●; hipertiroidea ▲ e hipotiroidea inyectada con  $\text{T}_3$  ○, se incubaron por 1 min con concentraciones crecientes de  $^{103}\text{Ru}_{360}$ . Transcurrido ese tiempo se centrifugaron y se lavaron con el mismo medio pero en presencia de 30  $\mu\text{M}$  del inhibidor frío. La radiactividad se midió en un contador para emisiones  $\gamma$ . El inserto muestra el análisis de Scatchard. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar.  $n = 5$ .

También utilizamos un inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida) para contrarrestar el efecto de la hormona T<sub>3</sub>, por lo que inyectamos simultáneamente T<sub>3</sub> y cicloheximida a las ratas durante 4 días. Posteriormente se prepararon mitocondrias y se estudió el transporte de calcio, la inhibición y la unión del inhibidor radiactivo. Los resultados demostraron que los valores tanto del transporte de Ca<sup>2+</sup>, la inhibición de éste y la unión del inhibidor radiactivo a las mitocondrias de las ratas hipertiroideas tratadas con cicloheximida, fueron muy similares a los obtenidos en el control (**Tablas 5 y 6**). Esto último también nos indica fuertemente que la hormona tiroidea esta regulando la síntesis del uniportador de calcio.

**Tabla 5. Determinación del transporte de Ca<sup>2+</sup>.** Se utilizaron mitocondrias controles, hipertiroideas e hipertiroideas tratadas con cicloheximida. Se utilizó el medio básico. La concentración de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> fue 150 µM y el tiempo de incubación de 10 s. Los valores representan la media ± la desviación estándar. \* Valores con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (prueba de t de student; p< 0.05). n= 5.

Rata	Velocidad (nmol de Ca <sup>2+</sup> /mg de prot./10 s)
Control	69.43 ± 3.62
Hipertiroidea	90.32 ± 0.45 *
Hipertiroidea + cicloheximida	67.84 ± 2.02

**Tabla 6. Determinación de las constantes de unión del inhibidor Ru<sub>360</sub> radiactivo.** Se utilizaron los datos de la figura 6 y la ecuación  $b = (B_m \times I) / (K_d + I)$  en el programa Microcal Origin 3.3; los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar. \* Valores con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (prueba de t de student;  $p < 0.05$ ).  $n = 5$ . Para la determinación de la  $B_{max}$  y de  $K_d$  en las mitocondrias de las ratas hipertiroideas+cicloheximida se utilizaron datos no mostrados.

Rata	$B_{max}$ (pmol/mg de prot.)	$K_d$ (nM)	Número de recambio ( $s^{-1}$ )
Control	$33.7 \pm 2.6$	$43.9 \pm 5.3$	344.2
Hipotiroidea	$26.7 \pm 2.4$ *	$49.2 \pm 8.3$	329.5
Hipo + T <sub>3</sub>	$34.9 \pm 4.6$	$49.9 \pm 11.3$	361
Hipertiroidea	$42.9 \pm 3.3$ *	$40.5 \pm 6.1$	333.3
Hipertiroidea +cicloheximida	$32.9 \pm 3.1$	$42.60 \pm 4.3$	349.5

Por último inyectamos ratas controles con la hormona tiroidea por 1 hasta 4 días buscando encontrar el tiempo aproximado en que se aumenta el transporte de  $Ca^{2+}$  y la unión del inhibidor radiactivo ( $^{103}Ru_{360}$ ) y con ello determinar cuanto tiempo tarda en sintetizarse el uniportador (Tabla 7). Los resultados muestran que el aumento en el transporte de calcio se da hasta el cuarto día y que dicho aumento concuerda con la mayor unión del inhibidor radiactivo.

**Tabla 7. Determinación del tiempo de síntesis del uniportador de calcio.** Se inyectaron a las ratas con la triiodotironina por 1 hasta a 4 días y se les extrajeron las mitocondrias para realizar ensayos de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se utilizaron  $150 \mu\text{M}$  de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Para la determinación de unión del inhibidor  $\text{Ru}_{360}$  se utilizó una concentración de  $70 \text{ nM}$  de  $^{103}\text{Ru}_{360}$ . El nivel de la hormona  $\text{T}_3$  se determinó por medio de RIA. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar. \* Valores con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (prueba de t de student;  $p < 0.05$ ).  $n = 5$ .

Día	Velocidad (nmol/mg de prot./10 s)	Unión (pmol/mg de prot.)	Nivel de $\text{T}_3$ en suero $\mu\text{g}/100\text{mL}$
Controles	$61.6 \pm 3.6$	$19.7 \pm 4.4$	$1.55 \pm 0.23$
1	$63.4 \pm 4.3$	$22.3 \pm 1.7$	$5.84 \pm 2.52$ *
2	$62.5 \pm 2.8$	$23.8 \pm 2.2$	$5.07 \pm 2.18$ *
3	$60.7 \pm 5.4$	$23.9 \pm 1.8$	$5.25 \pm 2.13$ *
4	$82.9 \pm 1.55$ *	$28.6 \pm 1.4$ *	$5.44 \pm 0.37$ *

## DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente la hormona tiroidea ejerce efectos importantes en el metabolismo energético. Los efectos sobre procesos mitocondriales pueden verse después de un tratamiento *in vivo* a largo plazo (3-6 días) con la hormona tiroidea (Shears y Bronk, 1981; Brand y Murphy, 1987; Hafner *et al.* 1988; Gregory y Berry, 1991; O'Reiley y Murphy, 1992; Kalderon *et al.* 1995) o inmediatamente después de su adición *in vitro* (Starkov *et al.*, 1997; Goglia *et al.* 1999). Actualmente se conoce que la T<sub>3</sub> regula la expresión de proteínas mitocondriales como la adenin nucleótido translocasa (Schönfeld *et al.* 1997) y de la proteína desacoplante (Larkin *et al.* 1997). Con base en todos estos reportes nosotros postulamos que la síntesis del uniportador de Ca<sup>2+</sup> también podría estar regulada por la hormona tiroidea.

De acuerdo con diversos trabajos (Greif, 1988, Schönfeld *et al.* 1997; Goglia *et al.* 1999) se puede observar un incremento del transporte de Ca<sup>2+</sup> en mitocondrias hipertiroideas, debido a un incremento de la velocidad de respiración que conlleva a un aumento del gradiente eléctrico, ya sea por la modificación de los lípidos de la membrana interna mitocondrial que puede permitir el paso libre de protones o por un incremento de la cantidad del uniportador en la mitocondria. Hummerich and Soboll en 1989, argumentan que la T<sub>3</sub> puede estimular la entrada de Ca<sup>2+</sup> por el incremento del consumo de oxígeno debido a un aumento de la síntesis de las enzimas que forman parte de la cadena transportadora de electrones (Weisner *et al.* 1992; Joste *et al.* 1989). La hormona T<sub>3</sub> también induce cambios en los lípidos de la membrana que pueden influir sobre los mecanismos de transporte. Específicamente se ha observado en mitocondrias hipotiroideas un incremento en la relación colesterol/fosfolípidos que puede disminuir la actividad del acarreador de fosfatos (Paradies *et al.* 1991). Adicionalmente, la habilidad de la adenin

nucléotido translocasa para convertirse en un poro inespecífico se modifica por la concentración de cardiolipina (Brustovetsky y Klingenberg, 1996), que también depende del estado tiroideo (Hoch *et al.* 1981; Hostetler, 1991). Nuestros datos muestran que la hormona tiroidea no modifica el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  debido al incremento de la velocidad de respiración y suponemos que tampoco se modifica por una alteración de la composición de lípidos de la membrana, sino por una diferencia en el grado de síntesis del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Actualmente se han hecho muchos esfuerzos para caracterizar la naturaleza química del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$ . Hasta la fecha, sin embargo, no ha sido posible establecerla claramente (Zazueta *et al.* 1991; Miranova *et al.* 1994; Zazueta *et al.* 1994). Por lo tanto, la estrategia experimental que se utilizó en este trabajo fue analizar el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , la inhibición de este transporte con un inhibidor específico ( $\text{Ru}_{360}$ ) y la unión de este inhibidor marcado radiactivamente ( $^{103}\text{Ru}_{360}$ ) a mitocondrias aisladas de hígado de ratas controles, hipo-, hiper- e hipotiroideas inyectadas con  $\text{T}_3$ . Cabe mencionar que una estrategia experimental similar fue utilizada por Schönfeld *et al.* en 1997 para estimar la cantidad del acarreador de ADP/ATP que es inducida por la hormona  $\text{T}_3$ , utilizando atractylósido marcado radiactivamente; y también por Ilyes y Stock en 1990 quienes usaron la unión de GDP radiactivo para estimar la concentración de proteína desacoplante, dependiente del estado tiroideo. Posteriormente se demostró el incremento de la expresión del ARN mensajero, una vez que se aisló el gen (Larkin *et al.* 1997).

Nuestra propuesta de que la hormona  $\text{T}_3$  regula la síntesis del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  se basa en que cuando se lleva a cabo la inhibición del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en los diferentes tipos de mitocondrias, se observa que a concentración cero de inhibidor existe un mayor transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en el hipertiroidismo, un menor transporte en el hipotiroidismo e igual

transporte en el hipotiroidismo tratado con  $T_3$ . Por otro lado al adicionar diferentes concentraciones del inhibidor, se observa que se necesita de una menor concentración del inhibidor para eliminar en un 85 % el transporte de calcio en el estado hipotiroideo y una mayor concentración del inhibidor para eliminar dicho transporte en el estado hipertiroideo, con respecto al control y lo más importante, cuando se administra la hormona  $T_3$  a las ratas hipotiroideas los valores en porciento de inhibición son similares al control. Los resultados anteriores nos hablan de un menor, mayor e igual numero de moléculas de uniportador  $Ca^{2+}$  en el hipotiroidismo, hipertiroidismo e hipotiroidismo tratado con  $T_3$  con respecto al control y que el uniportador no sufre ninguna modificación ya que muestra la misma afinidad.

Confirmando los datos anteriores la unión máxima ( $B_{max}$ ) del inhibidor  $^{103}Ru_{360}$  fue mayor en las mitocondrias hipertiroideas con respecto a las mitocondrias controles y observamos un efecto opuesto en las mitocondrias hipotiroideas. Cabe mencionar que el aumento en la unión del inhibidor radiactivo a las mitocondrias de las ratas hipertiroideas y la disminución de dicha unión a las hipotiroideas correlaciona en proporción con el aumento y la disminución que existió en el transporte de calcio en dichas mitocondrias. Esto último también nos sugiere que la diferencia en el transporte de calcio se debe principalmente a una variación en el número de moléculas de uniportador de calcio y no a los cambios en el consumo de oxígeno, permeabilidad de la membrana, etc.

Adicionalmente, cuando las ratas hipotiroideas fueron tratadas con la hormona  $T_3$ , el efecto de la disminución en el transporte de calcio, así como la disminución en la unión del inhibidor, desaparece completamente, alcanzando valores similares al de los controles. Esto sugiere fuertemente que la hormona tiroidea está ejerciendo un efecto de regulación a nivel de síntesis de proteína. Es importante señalar que el nivel de hormona tiroidea en plasma en dichas ratas fue alto, similar a la de las hipertiroideas, sin embargo no hubo un

igual aumento ni en el transporte de calcio ni en la unión del inhibidor radiactivo. Esto último lo atribuimos a que el tiempo de síntesis de uniportador que se determinó fue de 4 días como se ha visto en algunas proteínas de la cadena transportadora de electrones (Luciakova y Nelson, 1992; Soboll, 1993) o a un retraso en la expresión debido a factores como: diferente régimen de dosis de la hormona tiroidea (Mutvei y Nelson, 1989; Lanni *et al.* 1995; Goglia *et al.* 1999), al grado de respuesta específica del tejido que se utilice (Wiesner *et al.* 1992; Rohdich y Kadenbach, 1993), el estado de desarrollo del tejido investigado (Izquierdo *et al.* 1995), a la compleja regulación de la expresión de genes respiratorios y a la influencia del estado metabólico del tejido (Pillar y Seitz, 1997). Adicionalmente también se sabe que el método de inducción del hipotiroidismo como el uso de fármacos, la tiroidectomía, etc, tienen diferentes efectos sobre la influencia de la hormona (Mutvei *et al.* 1989; Lanni *et al.* 1996).

Confirmando lo anterior, cuando las ratas hipertiroideas se trataron con la cicloheximida, que es un inhibidor de la síntesis de proteínas, no existieron diferencias significativas ni en el transporte de calcio ni en la unión del inhibidor radiactivo con respecto al control. Existen diversos reportes en los que se ha documentado el efecto inhibitorio de la cicloheximida sobre la inducción de polipéptidos que es estimulada por la  $T_3$ ; en mitocondria el antibiótico inhibe el aumento en la actividad de la ATPasa provocado por dicha hormona (Almeida *et al.* 1995). La cicloheximida inhibe la expresión de los genes de los canales de bajo voltaje de  $Ca^{2+}$  en músculo esquelético que han sido inducidos por la hormona  $T_3$  (Brodie y Sampson, 1990), y por ejemplo, en extractos crudos de hígado este antibiótico inhibe la estimulación que ejerce la hormona  $T_3$  sobre la actividad de la  $Na^+K^+$ -ATPasa (Dey, 1990).

Es muy factible que el tiempo (aproximadamente 4 días) que nosotros estimamos para que la hormona influya sobre la síntesis del uniportador de calcio, sea el factor determinante, ya que en diversos trabajos se ha demostrado que solamente después de 2-5 días de un tratamiento con la hormona tiroidea se puede ver un efecto sobre la expresión de proteínas (Nelson *et al.* 1980, Nelson *et al.* 1984), mientras que un incremento en la transcripción/traducción del genoma mitocondrial y en la actividad de la RNA polimerasa mitocondrial se observa después de 24 horas de tratamiento con esta hormona (Mutvei *et al.* 1986). Adicionalmente se ha observado que la masa mitocondrial y la cantidad de algunos polipéptidos de la cadena respiratoria se incrementan después de 2-3 días de tratamiento (Mutvei *et al.* 1989; Joste y Nelson, 1989).

## CONCLUSIÓN

- Con los resultados mostrados anteriormente podemos decir, hasta el momento, que la síntesis del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$ , al igual que otras proteínas mitocondriales, está regulada por la hormona tiroidea.

## REFERENCIAS

1. Akerman, K.E. O. Effects of cation on the temperature sensitivity of  $\text{Ca}^{2+}$  transport in rat-liver mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **9**: 141-149, 1977
2. Akerman, K.E. O. Effects of  $\text{Mg}^{2+}$  and spermine on the kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in rat liver mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **9**: 65-72, 1977b
3. Akerman, K.E. O., and Nicholls, D. Physiological and bioenergetic aspects of mitochondrial calcium transport. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **95**: 150-193, 1983
4. Almeida, A., Orfao, A., López-Mediavilla, C., and Medina, J.M. Hypothyroidism prevents postnatal changes in rat liver mitochondrial populations defined by rhodamine-123 staining. *Endocrinology*, **136**: 4448-4453, 1995
5. Angel, R., Botta, J.A., Moreno, R.D., and Farias, R. Solubilization and purification of a membrane-associated 3,3',5-tri-iodo-L-thyronine-binding protein from rat erythrocytes. *Biochem. J.* **270**: 577-582, 1990
6. Blackshear, P.J., Nairn, A.C., and Kuo, J.F. Protein Kinases 1988: a current perspective. *FASEB J.* **2**: 2957-2969, 1988
7. Bernardi, P., and Azzone, G. Delta pH induced calcium fluxes in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **102**: 555-562, 1979
8. Bernardi, P., and Azzone, G. A membrane potential-modulated pathway for  $\text{Ca}^{2+}$  efflux in rat liver mitochondria. *FEBS Letters*, **139** (1): 13-16, 1982
9. Bernardi, P., Broekemeier, K., and Pfeiffer, D.R. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a Cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**(5): 509-517, 1994

10. Blondeau, J.P., Osty, J., and Francon, J. Characterization of the thyroid hormone transport system of isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **263**: 2685-2692, 1988
11. Bobadilla, L., Franco, M., Cruz, D., Zamora, J., Robles, S.G., and Chávez, C. Hypothyroidism provides resistance to reperfusion injury following myocardium ischemia. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* **33**: 499-506, 2000
12. Botta, J.A., De Mendozas, D., Moreno, R.D., and Farias, R.N. High affinity L-triiodothyronine binding sites on washed rat erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* **258** (11): 6690-6692, 1983
13. Bragadin, M., Pazzan, T., and Asoné, G.F. Kinetics of  $Ca^{2+}$  carrier in rat liver mitochondria. *Biochem.* **18**: 5972-5978, 1979
14. Brand, M.D., and Murphy, M.P. Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cell. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **62**: 141-193, 1987
15. Brand, M.D., Chien, L.F., Ainscow, E.K., Rolfe, D.F.S., and Porter, R.K. The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochem. Biophys. Acta* **1187**: 132-139, 1994
16. Brodie, C., and Sampson, S.R. Thyroid hormones up-regulate  $Ca^{2+}$ -channels in cultured skeletal muscle of the rat. *Neurosci. Lett.* **117** (6): 325-330, 1990
17. Brustovetsky, N., and Klingenberg, M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by  $Ca^{2+}$ . *Biochemistry*, **35**: 8483-8488, 1996
18. Bygrave, F.L., Reed, K. C., and Spencer, T. Cooperative interaction in energy-dependent accumulation of  $Ca^{2+}$  by isolated rat liver mitochondria. *Nature new Biol.* **230**: 89-91, 1971

19. Carafoli, E. The interaction of  $\text{Ca}^{2+}$  with mitochondria, with special reference to the structural role of  $\text{Ca}^{2+}$  in mitochondrial and other membranes. *Mol & Cell. Biochem.* **8** (3): 133-140, 1975
20. Carafoli, E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 395-433, 1987
21. Chávez, E., Briones, R., Michael, B., Bravo, C., and Jay, D. Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium transport. *Arch. Biochem. Biophys.* **242** (2): 493-497, 1985
22. Chávez, E., Zazueta, C., Reyes-Vivas, H., Pichardo, J., Corona, N., Uribe, A., and Chávez, R. Fluorescamine-induced membrane permeability in mitochondria. *Int. J. Biochem.* **24** (11): 1779-1784, 1992
23. Chávez, E., Franco, M., Reyes-Vivas, H., Zazueta, C., Ramírez, J., Carrillo, R. Hypothyroidism renders liver mitochondria resistant to the opening of membrane permeability transition pore. *Biochim. Biophys. Acta*, **1407**: 243-248, 1998
24. Cheng, S.Y. Characterization of binding and uptake of 3,3',5-triido-L-thyronine in cultured mouse fibroblasts. *Endocrinology* **112**: 1754-1762, 1983
25. Crompton, M., Sigel, E., Salzmann, M., and Carafoli, E. A kinetic study of the energy-linked influx of  $\text{Ca}^{2+}$  into heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **69**: 429-434, 1976
26. Davidoff, F. Effects of the guanidine derivates on mitochondrial function :  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and release. *J. Biol. Chem.* **249**: 6404-6415, 1974
27. De Nayer, P. Thyroid hormone action at the cellular level. *Horm. Res.* **26** (1-4): 48-57, 1987

28. **Denton, R., and McCormack, J.**  $\text{Ca}^{2+}$  as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Ann. Rev. Physiol.* **52**: 451-466, 1990
29. **Dey, S.S.** Induction of thyroid hormone in changing  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase activity in different organs of toad, *Bufo melanostictus*. *Gegenbaurs Morphol. Jahrb.* **136** (4): 493-499, 1990
30. **Dozin, B., Cahnmann, H., and Nikodem, V.** Comparative characterization of thyroid hormone receptors and binding proteins in rat liver nucleus, plasma membrane, and cytosol by photoaffinity labeling with L-thyroxine. *Biochemistry* **24** (19): 5203-5208, 1985
31. **Farber, J.L.** The role of calcium in lethal cell injury. *Chem. Res. Toxicol.* **3**: 503-508, 1990
32. **Garstka, H.L., Facke, M., Excribano, J.R., and Wiesner, R.J.** Stoichiometry of mitochondrial transcripts and regulation of gene expression by mitochondrial transcription factor A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**: 619-626, 1994
33. **Gavin, C., Gunter, K., and Gunter, T.** Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. *Biochem. J.* **266** (2): 329-334, 1990
34. **Gemba, M.** Effect of diuretics on ion transport of kidney cortex mitochondria. *Jpn. J. Pharmacol.* **24**: 271-277, 1974
35. **Gharbi-Chihi, J., and Torresani, J.** Thyroid hormone binding to plasma membrane preparations: studies in different thyroid states and tissues. *Endocrinol. Invest.* **4** (2): 177-183, 1981
36. **Goglia, F., Moreno, M., and Lanni, A.** Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS, Lett.* **452**: 115-120, 1999

37. **Gornall, A., Bardwill, C., and David, M.** Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**: 751-766, 1949
38. **Gregory, R.B., and Berry, M.N.** The administration of triiodothyronine to rats results in a lowering of the mitochondrial membrane potential in isolated hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1133**: 89-94, 1991
39. **Greif, R.L.** Thyroid status influences calcium ion accumulation and retention in rat liver mitochondria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **189**: 39-44, 1988
40. **Gunter, T., Wingrove, D., Banerjee, S., and Gunter, K.** Mitochondrial calcium transport. *Adv. Exp. Med. Biol.* **232**: 1-14, 1988
41. **Gunter, T., and Pfeiffer, D.** Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* **258**: C755-C786, 1990
42. **Gunter, K., Zuscik, M., and Gunter, T.** The  $\text{Na}^+$ -independent  $\text{Ca}^{2+}$  efflux mechanism of liver mitochondria is not a passive  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$  exchanger. *J. Biol. Chem.* **266** (32): 21640-21648, 1991
43. **Gunter, T.** Cation transport by mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26** (5): 471-485, 1994
44. **Gunter, K., and Gunter, T.** Transport of calcium by mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26** (5): 465-469, 1994
45. **Hafner, R.P.** Thyroid hormone uptake into the cell and its subsequent localization to the mitochondria. *FEBS Lett.* **224** (2): 251-256, 1987
46. **Hafner, R.P., Nobes, C.D., McGown, A.D., and Brand, M.D.** Altered relationship between proton motive force and respiration rate in non-phosphorylating liver mitochondrial isolated from rats of different thyroid hormone status. *Eur. J. Biochem.* **178**: 511-518, 1988

47. Halestrap, A.P. The regulation of the oxidation of fatty acids and other substrates in rat heart mitochondria by changes in the matrix volume induced by osmotic strength, valinomycin and  $\text{Ca}^{2+}$ . *Biochem. J.* **244**: 159-164, 1987
48. Hansford, R. Physiological role of mitochondrial calcium transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26** (5): 495-508
49. Harper, M.E., Ballantyne, J.S., Leach, M., and Brand, M.D. Effects of thyroid hormone on oxidative phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* **21**: 785-792, 1993
50. Hashizume, K., Ichikawa, K., and Kobayashi, M. Effect of calcium ion on triiodothyronine binding to kidney outer mitochondrial membrane in vitro. *Endocrinol. Jpn.* **31** (3): 311-320, 1984
51. Hashizume, K., Miyamoto, T., Ichikawa, K., Yamauchi, K., Kobayashi, M., Sakurai, A., Ohtsaka, H., Nishii, Y., and Yamada, T. Purification and characterization of NADPH-dependent cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine binding protein in rat kidney. *J. Biol. Chem.* **264** (9): 4857-4863, 1989
52. Heaton, G.M., and Nicholls, D.G. The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient. *Biochem J.* **156** (3): 635-646, 1976
53. Hoch, F.L., Subramanian, C., Dhopeswarkar, G.G., and Mead, J.F. Thyroid control over biomembranes: VI. Lipids in liver mitochondria and microsomes of hypothyroid rats. *Lipids*, **16**: 328-335, 1981
54. Horiuchi, R., Yamauchi, K., Hayashi, H., Koya, S., Takeuchi, Y., Kato, K., Kobayashi, M., and Takikawa, H. Purification and characterization of 55-kDa protein with 3,5,3'-triiodo-L-thyronine-binding activity and protein disulfide-isomerase activity from beef liver membrane. *Eur. J. Biochem.* **183** (3): 529-538, 1989

55. **Hostetler, K.Y.** Effect of thyroxine on the activity of mitochondrial cardiolipin synthase in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **1086**: 139-140, 1991
56. **Humerich, H., and Soboll, S.** Rapid stimulation of calcium uptake into rat liver by L-tri-iodothyronine. *Biochem. J.* **258**: 363-367, 1989
57. **Hunter, D., Haworth, R., and Southard, J.** Relationship between configuration, function and permeability in calcium-treated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **25** (16): 5069-5077, 1976
58. **Hutson, S. M., Pfeifer, D.R., and Lady, H. A.** Effect of cations and anions on the steady state kinetics of energy-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in rat liver mitochondria. *J. Biol. Biochem.* **251**: 5251-5258, 1976
59. **Hutson, S. M.** Steady state of the energy-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in rat liver mitochondria. *J. Biol. Biochem.* **252**: 4539-4545, 1977
60. **Ichikawa, K., and Hashizume, K.** Cellular binding proteins of thyroid hormones. *Life Sci.* **49**(21): 1513-1522, 1991
61. **Igbavboa, U., Zwizinski, C., and Pfeiffer, D.** Release of mitochondrial matrix proteins through a  $\text{Ca}^{2+}$ -requiring, cyclosporine-sensitive pathway. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **161** (2): 619-625, 1989
62. **Imberti, R., Vairetti, M., Richelmi, P., Preseglio, L., and Bellomo, G.** Thyroxine pretreatment and halothane administration alter  $\text{Ca}^{2+}$  transport and membrane potential in rat liver mitochondria. An additional mechanism for halothane-induced liver damage in hyperthyroid rat model. *Arch. Toxicol.* **68**: 103-109, 1994
63. **Ilyes, I., and Stock, M. J.** Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on thermogenic responses to selective and nonselective beta-adrenergic agonists in rats. *Acta Med. Hung.* **47**: 179-188, 1990

64. Izquierdo, J.M., Jiménez, E., and Cuezva, J.M. Hypothyroidism affects the expression of the  $\beta$ -subunit-F1-ATPase gene and limits mitochondrial proliferation in the rat liver at all stages of development. *Eur. J. Biochem.* **232**: 344-350, 1995
65. Joste, V., Goitom, Z., and Nelson, B.D. Thyroid hormone regulation of nuclear-encoded mitochondrial inner membrane polypeptides of the liver. *Eur. J. Biochem.* **184**: 255-260, 1989
66. Joste, V., and Nelson, B.D. (1989) in *Cytochrome systems: molecular biology and bioenergetics* (Papa, S. Et al., eds) Plenum Publishing Corp., New York, in the press.
67. Kalderon, B., Hermesh, O., and Bar-Tana, J. Mitochondrial permeability transition in induced by *in vivo* thyroid hormone. *Endocrinology* **136**: 3552-3556, 1995
68. Krenning, E.P., Docter, R., Bernard, H.F., Visser, T.J., and Heinemann, G. Characteristics of active transport of thyroid hormone into rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **676**: 314-320, 1981
69. Kroemer., G., Zamzami, N., and Susin, S. Mitochondrial control of apoptosis. *Immun. Today*, **18** (1): 44-51, 1997
70. Landeta, L.C., Gonzales-Padrones, R., and Rodríguez-Fernandez, C. Uptake of thyroid hormones (L-T3 and L-T4) by isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145** (1): 105-110, 1987
71. Lanni, A., Cimmino, M., Moreno, M., Gatti, D.A., Ginestra, A., and Goglia, F. Relationship between dose, mode of administration and effects of triiodothyronine on two hepatic responsive enzymes. *Horm. and metabolic Res.* **27** (7): 314-317, 1995
72. Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A., and Goglia, F. Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat. *J. Physiol.* **494** (Pt 3): 831-837, 1996

73. Larkin, S., Mull, E., Miao, W., Pittner, R., Albrandt, K., Moore, C., Young, A., Denaro, M., and Beaumont, K. Regulation of the third member of the uncoupling protein family, UCP3, by cold and thyroid hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**: 222-227, 1997
74. Luciakova, K., and Nelson, D. Transcript levels for nuclear-encoded mammalian mitochondrial respiratory-chain components are regulated by thyroid hormone in an uncoordinated fashion. *Eur. J. Biochem.* **207**: 247-251, 1992
75. McMillian-Wood, J., Wolkowicz, P.E., Chu, A., Tate, C.A., Goldstone, M.A; and Entman, M.L. Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart. *Biochim. Biophys. Acta*, **591**: 251-265, 1980
76. Miranova, G. D., Baumann, M., Kolomytkin, O., Krasichkova, Z., Berdimuratov, A., Sirota, T., Virtanen, L., and Saris, N.E.L. Purification of channel component of the mitochondrial calcium uniporter and its reconstitution into planar lipid bilayers. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**: 231-238, 1994
77. Morel, G., Ricard-Blum, S., and Ardail, D. Kinetics of internalization and subcellular binding sites for T3 in mouse liver. *Biol. Cell.* **86**: 167-174, 1996
78. Moreno-Sánchez. Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **260**: 12554-12560, 1985
79. Mutvei, A., and Nelson, B.D. The response of individual polypeptides of the mammalian respiratory chain to thyroid hormone. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**: 215-220, 1989
80. Mutvei, A., Kuzela, S., and Nelson, B.D. Control of mitochondrial transcription by thyroid hormone. *Eur. J. Biochem* **180**: 235-240, 1989

81. Nelson, B.D., Joste, V., Wielburski, A., and Rosenqvist, U. The effects of triiodothyronine on the synthesis of mitochondrial proteins in isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys Acta* 608 (2): 422-426, 1980
82. Nelson, B.D., Mutvei, A., and Joste, V. Regulation of biosynthesis of the rat liver inner mitochondrial membrane by thyroid hormone. *Arch. Biochem. Biophys.* 228 (1): 41-48, 1984
83. Nicchitta, C., and Williamson, J. Spermine. A regulator of mitochondrial calcium cycling. *J. Biol. Chem.* 259 (21): 12978-12983, 1984
84. Noack, E., and Greeff, K. Inhibition of calcium transport in mitochondria by  $\beta$ -receptor blocking substances and its reactivation by phospholipids. *Experientia Basel* 27: 810-811, 1971
85. O'Reiley, I., and Murphy, M.P. Studies on the rapid stimulation of mitochondria respiration by thyroid hormones. *Acta Endocrinol.* 127: 542-546, 1992
86. Osty, J., Jego, L., Francon, J., and Blondeau, J.P. Characterization of triiodothyronine transport and accumulation in rat erythrocytes. *Endocrinology* 123 (11): 2303-2311, 1988
87. Paniagua, R., Franco, M., Rodríguez, L.G., Sánchez, J., and Herrera, J. Impaired atrial natriureic factor systemic clearance contributes to its higher levels in uremia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2: 1704-1708, 1992
88. Paradies, G., and Ruggiero, F.M. Enhance activity of tricarboxylate carrier and modification of lipids in hepatic mitochondria from hyperthyroid rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 278: 425-430, 1990

89. **Paradies, G., Rugguiero, F.M., and Dinoi, P.** The influence of hypothyroidism on the transport of phosphate and on the lipid composition in rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys Acta*, **1070**: 180-186, 1991
90. **Paradies, G., Rugguiero, F.M., Dinoi, P., Petrosillo, G., Quagliariello, E.** Decreased cytochrome oxidase activity and changes in phospholipids in heart mitochondria from hypothyroid rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**: 91-95, 1993
91. **Pfeiffer, D. R., Kuo, T.H., and Tchen, T.T.** Some effects of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{Mn}^{2+}$  on the ultrastructure, light-scattering properties, and malic enzyme activity of adrenal cortex mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **176**: 556-563, 1976
92. **Pillar, T.M., and Seitz, H.J.** Thyroid hormone and gene expression in the regulation of mitochondrial respiratory function. *Eur. J. Endocrinol.* **136**: 231-239, 1997
93. **Pliam, N.B., and Golfine, I.D.** High affinity thyroid hormone binding sites on purified rat liver plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**: 166-172, 1977
94. **Qian, T., Nieminen, A., Herman, B., and Lemasters, J.** Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* **272** (6)(Pt1): C1792-C1793, 1997
95. **Rasmussen, A., and Barrett, P.Q.** Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol. Rev.* **64**: 938-978, 1984
96. **Reed, K. C., and Bygrave, F.L** A kinetic study of mitochondrial calcium transport. *Biochem J.* **138**: 239-252, 1974
97. **Richter, C.** Prooxidants and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ : their relationship to apoptosis and oncogenesis. *FEBS Letters.* **325** (1-2): 104-107, 1993
98. **Rohdich, F., and Kadenbach, B.** Tissue-specific regulation of cytochrome c oxidase efficiency by nucleotides. *Biochemistry*, **32** (33): 8499-8501, 1993

99. Samson, M., Osty, J., Francon, J., and Blondeau, J.P. Triiodothyronine binding sites in the rat erythrocyte membrane: involvement in triiodothyronine transport and relation to the tryptophan transport System T. *Biochim. Biophys. Acta*, **1108**: 91-98, 1992
100. Scarpulla, R.C. Nuclear respiratory factors and the pathways of nuclear-mitochondrial interaction. *Trends Cardiovasc. Med.* **6**: 39-45, 1996
101. Scarpa, A., and Graziotti, P. Mechanism for intracellular  $Ca^{+2}$  regulation in heart. *J. Gen Physiol.* **62**: 756-772, 1973
102. Schönfeld, P., Mariusz, R., Więckowski, M.R., and Wojtczak, L. Thyroid hormone-induced expression of the ADP/ATP carrier and its effect on fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* **416**: 19-22, 1997
103. Segal, J., and Ingbar, S. Specific binding sites for the triiodothyronine in the plasma membrane of rat thymocytes. Correlation with biochemical responses. *J. Clin. Invest.* **70** (5): 919-926, 1982
104. Shears, S.B., and Bronk, J.R. The effects of thyroxine treatment, in vivo and in vitro, on  $Ca^{2+}$  efflux from liver mitochondria. *FEBS Lett.* **126**: 9-12, 1981
105. Soboll, S. Thyroid hormone action on mitochondrial energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1144**: 1-16, 1993
106. Starkov, A.A., Simoyan, R.A., Dedukhova, V.I., Mansurova, S.E., Palamarchuk, L.A., and Skulachev, V.P. Regulation of the energy coupling in mitochondria by some steroid and thyroid mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**: 173-183, 1997
107. Sterling K., Campbell, G.A., and Brenner, M.A. Purification of the mitochondrial triiodothyronine (T3) receptor from rat liver. *Acta Endocrinol.* **105** (3): 391-397, 1984

108. Susuki, S., Hashizume, K., Ichikawa, K., and Takeda, T. Ontogenesis of the high affinity NADPH-dependent cytosolic 3,5,3'- triiodo-L-thyronine-binding protein in rat. *Endocrinology* 129: 2572-2578, 1991
109. Tashmukhamedov, B.A., Gagelgans, A. L., Mamatkulov, K., and Makhmudova, E.M. inhibition of  $Ca^{2+}$  transport in mitochondria by selective blockade of membrane mucopolysaccharides by hexamine cobaltichloride. *FEBS Lett.* 28: 239-242, 1972
110. Vercesi, A., Reynafarge, B., and Lehninger, A. L. Stoichiometry of  $H^+$  ejection and  $Ca^{+2}$  uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. *J. Biol. Biochem.* 253: 6379-6385, 1978
111. Voet, D. and Voet, J. (1996) Biochemistry. John Wiley and Sons, INC. 2<sup>nd</sup> edition. Pag. 563-598
112. Vinogradov, A., and Scarpa, A. The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 49: 607-607, 1973
113. Virbasius, J.V. and Scarpulla, R.C. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (4): 1309-1313, 1994
114. Weisner, R.J., Kurouski, T.T., and Zak, R. Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome c in rat liver and skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.* 6: 1458-1467, 1992
115. Whittaker, P., and Danks, S. (1978) Mitocondria: Estructura, función y formación. Editorial Continental, S.A. México. Pag. 173

116. Wingrove, D., and Gunter, T. Kinetics of mitochondrial calcium transport. I. Characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **261** (32): 15159-15165, 1986
117. Wolkowicz, P., Michael, L., Lewis, R. And McMillin-Wood, J. Sodium-calcium exchange in dog heart mitochondria: effects of ischemia and verapamil. *Am. J. Physiol.* **244** (5): H644-H651, 1983
118. Wrutniak, C., and Cabello, G. La voie d'action mitochondriale de la triiodothyronine: mythe ou réalité?. *Med. Sci.* **12**, 475-484, 1996
119. Wrutniak, C., Cassar-Malek, I., Marchal, S., Rasclé, A., Heusser, S., Keller, J.M., Flechon, J., Dauca, M., Samarut, J., Ghysdael, J., and Cabello, G. A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J. Biol. Chem.* **270** (27): 16347-16354, 1995
120. Yamada, E. W., and Huzel, N.J. Calcium-binding ATPase inhibitor protein of bovine heart mitochondria. Role in ATP synthesis and effect of  $Ca^{2+}$ . *Biochemistry*, **28**: 9714-9718, 1989
121. Ying, W., Emerson, J., Clarke, M., and Sanadi, R. Inhibition of mitochondrial calcium ion transport by an oxo-bridged dinuclear ruthenium ammine complex. *Biochemistry*, **30**: 4949-4952, 1991
122. Zazueta, C., Holguín, J.A., and Ramírez, J. Calcium transport sensitive to ruthenium red in cytochrome oxidase vesicles reconstituted with mitochondrial proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 889-902, 1991
123. Zazueta, C., Massó, F., Páez, A., Bravo, C., Vega, A., Montañó, L., Vázquez, M., Ramírez, J., and Chávez, E. Identification of a 20 kDa protein with calcium uptake

transport activity. Reconstitution in a membrane model. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**: 555-562, 1994

124. Zazueta, C., Sosa-Torres, ME., Correa, F., and Garza-Ortiz A. Inhibitory properties of ruthenium mine complexes on mitochondrial calcium uptake. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**(6): 551-557, 1999

125. Zoratti, M., and Szabó, I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*, **124**: 139-176, 1995.