



00562  
1  
**UNAM**  
**POSGRADO**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOQUÍMICAS

FACULTAD DE QUÍMICA

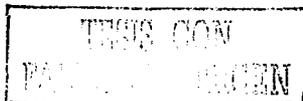
*IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS GLICOSÍDICOS  
ASOCIADOS AL UNIORTADOR DE CALCIO  
MITOCONDRIAL*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

BIOL. FRANCISCO CORREA SEGURA



MÉXICO, D.F.

2003

A



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.

**JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE

Dr. Armando Gómez Puyou

VOCAL

Dra. Irma Bernal Lugo

SECRETARIO

Dra. Marina Gavilanes Ruiz

SUPLENTE

Dr. Heliodoro Celis Sandoval

SUPLENTE

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

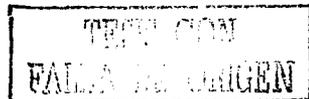
Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

**ASESOR DEL TEMA**

Dr. Edmundo Chávez Cossio

**SUSTENTANTE**

Biol. Francisco Correa Segura



B

*A Mónica*

TESIS CION  
UNIVERSIDAD DE BARRIEN

c

### **Agradecimientos:**

A través de este medio deseo expresar mi profundo agradecimiento a las siguientes instituciones y personas:

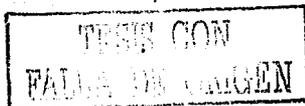
A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de química

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología a través de los proyectos 34387-N y 36606-N

Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología

A la Dra. Ana Cecilia Zazueta y al Dr. Edmundo Chávez por sus enseñanzas y por ser parte fundamental en mi formación como investigador.



## Dedicatorias:

Con mucho cariño y amor para mi querida familia empezando por los dos personitas más grandes y maravillosas de mi vida: a mi papá Francisco y a mi mamá Lourdes.

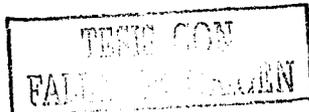
A mis hermanos: Lulú, Julio y Violeta. A los gumis (Sergio y Eduardo). A mis abuelos: Porfiria, Evelia, Epifanio y Florencio. A mis Tíos: Licha, Chuchin, Martha, Hugo, Bertha Balta y Chore. A mis primos: Andy, Fer y Jesús Manuel.

A mis amigos: Ustedes ya se conocen y saben quienes son

A mis compañeros del laboratorio: Noemí, Ceci, Norma, David, Ricardo, José salud, Gerardo, César

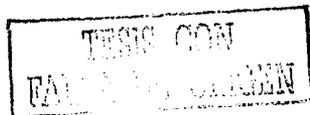
A toribio , derby ( bruno berenice), a watson y a bobí , a herry y al bote, a la palma y al puesto

Y por supuesto al amor de mi vida: Mónica

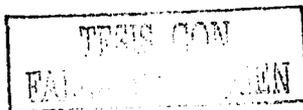


# CONTENIDO

<b>Abreviaturas</b>	4
<b>Resumen</b>	5
<b>Introducción</b>	6
Regulación de la concentración de $\text{Ca}^{+2}$ en la mitocondria.	7
Características del sistema de captación de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial.	11
Características Cinéticas del Uniportador Mitocondrial del $\text{Ca}^{2+}$ .	13
Inhibición de la entrada de $\text{Ca}^{2+}$	15
Purificación del uniportador mitocondrial de calcio.	17
A. Los primeros intentos.	18
B. Evidencia de glicoproteínas en los diferentes compartimientos mitocondriales	19
C. Purificación de una glicoproteína mitocondrial asociada a movimientos de calcio.	21
<b>Objetivos</b>	28
<b>Hipótesis</b>	29



<b>Material y Métodos</b>	30
Preparación de mitocondrias	30
Preparación de fracciones mitocondriales	30
Enzimas marcadoras de diferentes organelos	32
Enzimas marcadoras para compartimentos mitocondriales	36
Acumulación de calcio	37
Síntesis del análogo del rojo de rutenio	38
Unión de Ru 360	39
Detección de proteínas con anticuerpos	40
Deglicosilación de glicoproteínas	41
Estrategia experimental	42
<b>Resultados</b>	43
<b>Discusión</b>	66
<b>Conclusiones</b>	72
<b>Bibliografía</b>	73



## Abreviaturas.

ADP: adenosín-5' difosfato

ATP: adenosin-5' trifosfato

Bmax: unión máxima

BSA: albúmina sérica de bovino

CCCP: carbonilcianuro-m-cloro-fenilhidrazona

EDTA: etilendiamina tetracético

EGTA: etilenglicol tetracético

HEPES: (N-[hidroxietil] piperacina-N'-[2-etanosulfónico])

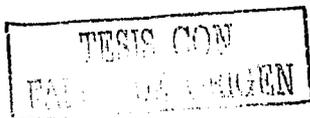
R R : rojo de rutenio

Ru 360: rutenio 360

SDS: dodecil sulfato de amonio

TRIS: [tris (hidroximetil) aminometano]

TX 100: Triton



## RESUMEN:

El uniportador de calcio mitocondrial es responsable de la acumulación de este catión en la matriz, así como de otros cationes divalentes y lantánidos (Gunter y cols., 1990). A pesar de lo mucho que se sabe del uniportador de calcio en cuanto a su comportamiento cinético, se sabe poco sobre su identidad molecular. Aun más, existe gran controversia en cuanto a la naturaleza glicoproteica del mismo. Se ha reportado que una glicoproteína de 45 kDa y un péptido de 3 kDa podrían estar asociados al transporte de calcio mitocondrial; sin embargo, mediante la utilización de anticuerpos y análisis de la secuencia del extremo del amino terminal se determinó que la glicoproteína era un contaminante citosólico (Mironova y cols., 1994). Los datos más recientes sugieren que el uniportador de calcio podría ser una proteína compuesta por dos subunidades (Zazueta y cols., 1999).

A partir de una fracción purificada de mitocondrias, es decir, libre de aquellos organelos celulares donde se encuentran típicamente glicoproteínas (membrana plasmática, aparato de Golgi y retículo endoplásmico) evaluamos el transporte de calcio en mitocondrias y mitoplastos tratados con N-glicosidasa F con diferentes concentraciones de inhibidores específicos del transporte. Los resultados mostraron una disminución en la capacidad inhibitoria del rojo de rutenio y del rutenio 360 sobre el transporte de calcio. Por otro lado la unión específica del rutenio 360 a mitoplastos tratadas con glicosidasa, fue de 1.64 pmol/ 0.1 mg, mientras que los controles presentan una unión máxima de 3.75 pmol /0.1mg.

Otros datos que apoyan la propuesta del carácter glicosídico del uniportador, son los que encontramos al evaluar el transporte de calcio en presencia de Concanavalina A, donde se obtuvo una inhibición total utilizando 2mg de concanavalina A por mg de proteína mitocondrial en el medio de transporte.

Mediante la estrategia experimental que hemos desarrollado podemos sugerir que el uniportador de calcio mitocondrial tiene al menos un residuo glicosídico formando parte de su estructura, y que probablemente este residuo está involucrado en el anclaje de inhibidores específicos del transporte de calcio mitocondrial, tales como el rojo de rutenio y el rutenio 360. Este residuo glicosídico no está relacionado con el transporte de calcio.

Trabajo apoyado parcialmente por los proyectos 28666-N y 34387-N de CONACYT

TESTE CON  
FALLA DE ORIGEN

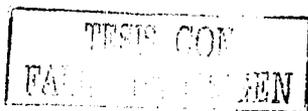
## INTRODUCCIÓN .

La mitocondria es el organelo donde se lleva a cabo el metabolismo oxidativo en eucariontes. Contiene, como Albert Lehninger y Eugene Kennedy mostraron en 1948, las enzimas que median este proceso, incluyendo a la piruvato deshidrogenasa, las enzimas del ciclo del ácido cítrico, las enzimas que catalizan la oxidación de los ácidos grasos y las enzimas y proteínas redox implicadas en el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa. Es pues, con razón que se describe a la mitocondria como la central "productora de energía" de la célula.

El compartimiento mitocondrial interno, denominado matriz, consiste en una sustancia de apariencia gelatinosa con menos de 50% de agua, que contiene concentraciones notablemente elevadas de enzimas solubles del metabolismo oxidativo, así como sustratos, cofactores nucleotídicos e iones inorgánicos. La matriz contiene también la maquinaria genética mitocondrial -DNA, RNA y ribosomas- que sintetiza algunas proteínas mitocondriales.

La membrana mitocondrial externa contiene una porina, proteína que forma poros no específicos, que permiten la libre difusión de moléculas de hasta 10kDa.

La membrana interna, la cual contiene aproximadamente 75% en peso de proteínas, es completamente permeable al  $O_2$  ,  $CO_2$  y  $H_2O$  y

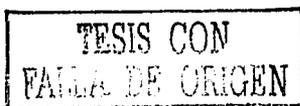


contiene, además de las proteínas de la cadena respiratoria , numerosas proteínas de transporte que controlan el paso de metabolitos como el ATP, ADP, piruvato ,  $\text{Ca}^{+2}$  y fosfato. La impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna permite el control del flujo de la mayoría de los iones, metabolitos y compuestos de masa molecular pequeña, permite la generación de gradientes iónicos a través de esta barrera y da lugar a la compartimentalización de las funciones metabólicas entre el citosol y la mitocondria.

### **Regulación de la concentración de $\text{Ca}^{+2}$ en la mitocondria.**

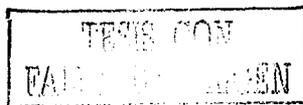
La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la mitocondria se regula por tres mecanismos independientes. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se efectúa a través de un uniportador y la salida involucra 2 procesos que pueden depender o no de la presencia de  $\text{Na}^+$  en el medio. Además, existe un cuarto mecanismo que permite la liberación de grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$ , a través de un poro inespecífico que se forma en la membrana interna en respuesta a varios agentes (Gunter y Pfeiffer , 1990) figura 1.

La principal función de los sistemas transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria es regular la concentración de este ión dentro de la



matriz, debido a que el  $\text{Ca}^{2+}$  libre afecta la velocidad de flujo de la vía de la fosforilación oxidativa.

La velocidad de síntesis de ATP varía en presencia de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  entre  $0.1 \mu\text{M}$  y  $1 \mu\text{M}$ , el mismo intervalo en el que puede variar la concentración de este ión en respuesta a estímulos hormonales o eléctricos en condiciones fisiológicas (Denton 1980; Hansford 1985; Brand y Murphy 1987). Algunas hormonas como el glucagon y la vasopresina, así como algunos agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, pueden aumentar la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  de  $0.1 \mu\text{M}$  hasta  $0.5 - 1 \mu\text{M}$  (Marban y Rink, 1980; Hoek, 1992), y esto puede traducirse en un incremento en la concentración intramitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  que activa la deshidrogenación de sustratos (Moreno-Sánchez y Hansford, 1988), por lo que se ha propuesto al  $\text{Ca}^{2+}$  como un regulador de la velocidad de síntesis de ATP mitocondrial *in vivo* (Hansford, 1985; MacCormack y cols, 1990) Tabla 1.



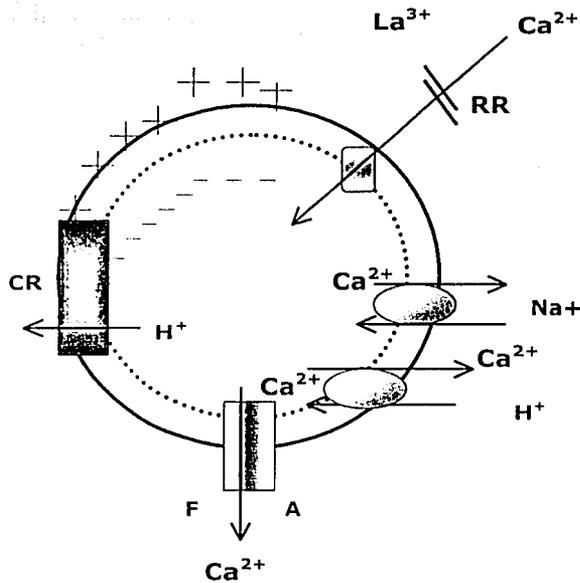
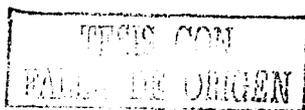


Figura 1. Transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana interna mitocondrial. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria se lleva a cabo por medio de un transportador dependiente del potencial eléctrico transmembranal mantenido por el bombeo de protones a través de los complejos respiratorios (CR). Este transporte es inhibido por rojo de rutenio (RR),  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{La}^{3+}$ . La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  se efectúa en intercambio con  $\text{Na}^+$  o  $\text{H}^+$  y a través de un poro inespecífico que se forma en la membrana interna mitocondrial cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es elevada y están presentes ciertos agentes como el fosfato (F) o el arsenato (A).

Tabla 1. Sistemas enzimáticos mitocondriales regulados por  $\text{Ca}^{2+}$ .  
Tomada de Moreno - Sánchez (1988).

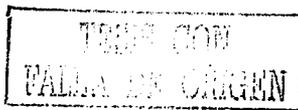
ACTIVACIÓN	Localización	$K_{0.5}$ ( $\mu\text{M}$ )	para $\text{Ca}^{2+}$	Referencias
Glicerol-1-Pi Deshidrogenasa	Cara externa de la membrana mitocondrial		0.6	Wernette y cols., 1981
Piruvato Deshidrogenasa Fosfatasa	Matriz mitocondrial		1.08	Denton y MacCormack, 1980
Isocitrato Deshidrogenasa	Matriz mitocondrial		1.19	Denton y cols., 1978
Oxoglutarato Deshidrogenasa	Matriz mitocondrial		1.03	Denton y MacCormack 1980
Succinato deshidrogenasa	Cara interna de la membrana interna mitocondrial		1.3	Ezawa y Ogata, 1979
<b>INHIBICIÓN</b>				
Piruvato Carboxilasa	Matriz mitocondrial		10-25nmol/mg	Foldes y Barrit, 1977
Piruvato Deshidrogenasa Cinasa	Matriz mitocondrial		0.01-0.5	Cooper y cols., 1974
Carbamil fosfato sintetasa	Matriz mitocondrial		10-15nmol/mg	Meljer y cols., 1981



## Características del sistema de captación de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial

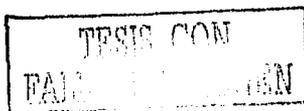
Vasington y Murphy (1962) descubrieron que la mitocondria es capaz de acumular  $\text{Ca}^{2+}$ . La captación está asociada a la respiración y a la hidrólisis de ATP, pudiéndose captar este catión incluso en contra de su gradiente. Los inhibidores de la cadena respiratoria inhiben la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando el potencial transmembranal se sostiene por la oxidación de sustratos, mientras que en presencia de ATP el transporte es inhibido por oligomicina, un inhibidor de la ATPasa mitocondrial (Lehninger y cols., 1967). En presencia de Pi y ADP la mitocondria es capaz de acumular hasta 3  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  por mg de proteína (Scarpa y Azzone, 1970). El transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  también se promueve por la salida de  $\text{K}^+$  inducida por valinomicina (Scarpa y Azzone, 1970). Todas estas evidencias indican que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  depende de la energía del potencial transmembranal; es decir, el mecanismo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria es un proceso secundario dependiente de la respiración o de la hidrólisis de ATP.

Las mitocondrias de todos los vertebrados y de muchos invertebrados estudiados son capaces de transportar  $\text{Ca}^{2+}$  (Bygrave, 1977; Lehninger y cols., 1967); este transporte se manifiesta en ciertas especies desde las etapas embrionarias (Bygrave y Ash, 1997).



En condiciones cercanas a las fisiológicas la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que se acumula es mucho menor a  $3 \mu\text{mol/mg}$ ; alrededor de  $50 \text{ nmol}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia de  $\text{Pi}$ , o de  $100\text{-}200 \text{ nmol/mg}$  en presencia  $\text{Pi}$ . En estas condiciones las funciones mitocondriales no se alteran (Slater y Cleland, 1953; Brierley y cols., 1964).

Varios cationes son transportados a la matriz mitocondrial a través de este acarreador. La selectividad del transporte es la siguiente:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$  (Drahota y cols., 1969; Vainio y cols., 1970; Reed y Bygrave, 1974). También son transportados fierro, plomo y lantánidos (Kapoor y cols., 1985; Reed y Bygrave, 1974; Vainio y cols., 1970). En mitocondrias de corazón, el transporte de  $\text{Mg}^{2+}$  ocurre por un transportador diferente al acarreador de  $\text{Ca}^{2+}$  (Brierley y cols., 1987; Crompton y cols., 1976; Diwan, 1987), mientras que en cerebro e hígado los inhibidores del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  inhiben también el transporte de  $\text{Mg}^{2+}$  (Rugolo y Zoccarato, 1984; Kun, 1976). El transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene baja actividad de transporte de  $\text{Mg}^{2+}$  (Chapell y cols., 1963, Vainio y cols., 1970); sin embargo, la completa exclusión del transporte de  $\text{Mg}^{2+}$  a través del acarreador de  $\text{Ca}^{2+}$  parece ser tejido específica, existen evidencias de que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no se efectúa en intercambio con ningún otro ión (Lehninger y cols., 1967; Rottenberg y Scarpa., 1974; Scarpa y Azzone., 1970).



La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria ocurre a favor de su gradiente electroquímico, como se esperaría para un uniportador, siguiendo la relación,

$$\Delta\mu_{\text{Ca}^{2+}} = RT \ln \frac{[\text{Ca}^{2+}]_r}{[\text{Ca}^{2+}]_d} + 2 F(\varphi_r - \varphi_d)$$

donde  $\Delta\mu_{\text{Ca}^{2+}}$  es el gradiente de potencial electroquímico transmembranal de  $\text{Ca}^{2+}$ , R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta,  $[\text{Ca}^{2+}]_r$  es la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  fuera de la mitocondria,  $[\text{Ca}^{2+}]_d$  es la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la mitocondria, F es la constante de Faraday y  $\varphi_r$  y  $\varphi_d$  corresponden al potencial eléctrico fuera y dentro de la mitocondria, respectivamente.

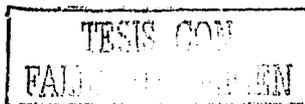
### Características cinéticas del uniportador mitocondrial de $\text{Ca}^{2+}$

El uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  presenta alta afinidad por este catión. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima ( $K_{0.5}$ ) se ha reportado entre 1-189  $\mu\text{M}$  (Åkerman, 1977b; Crompton y cols., 1976; Hutson, 1977; Pfeiffer y cols., 1976; Vinogradov y Scarpa., 1973). Los valores de velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ ) en mitocondrias de hígado oscilan entre 700 y 1200 nmol/min mg (Bragadin y cols., 1979; Hutson y cols., 1976; Vinogradov y cols., 1973); mientras que en mitocondrias de corazón tienen

una valor entre 400 y 1170 nmol/min mg (McMillin-Wood y cols., 1980; Vercesi y cols., 1978). Generalmente se dice que el transporte es mayor en hígado que en corazón, pero la velocidad más alta que se ha reportado se midió en mitocondrias de corazón de perro: 1750nmol/min/mg (McMillin-Wood y cols., 1980). Por otro lado, aún los valores más altos de velocidad reportados resultan subestimados, ya que la velocidad es limitada por el potencial transmembranal.

El transporte de calcio sigue un comportamiento sigmoidal con respecto a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , con un coeficiente de Hill que varía entre 1.7 y 2 (Bragadin y cols., 1979; Bygrave y cols., 1971; Heaton y Nicholls, 1976; Hutson y cols., 1976; Reed y Bygrave, 1975; Scarpa y Graziotti, 1973; Vinogradov y Scarpa, 1973). 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 (Åkerman, 1977b; Åkerman, 1977; Bragadin y cols., 1979; Crompton y cols., 1976). Una alta concentración de iones impermeables como  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Li}^{2+}$ , así como bajas temperaturas incrementan la sigmoidicidad del proceso (Bragadin y cols., 1979).

Un coeficiente de Hill de 2 indica 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. Se ha descrito que cuando se unen concentraciones nanomolares de  $\text{Ca}^{2+}$  al uniportador de



calcio, la sigmoidicidad del transporte de  $Mn^{2+}$  se pierde y su velocidad aumenta, lo cual se explica diciendo que el  $Ca^{2+}$  se une a un sitio de activación que disminuye la energía de activación requerida para el transporte, con lo que aumenta la velocidad de transporte de  $Mn^{2+}$  (Vinogradov y Scarpa, 1973). La velocidad de disociación de  $Ca^{2+}$  de este sitio es lenta, comparada con la velocidad de transporte (Kröner, 1986 y Riley, 1986).

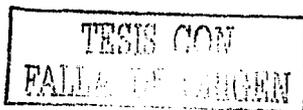
### **Inhibición de la entrada de $Ca^{2+}$**

Los inhibidores del transporte de  $Ca^{2+}$  pueden ser de cuatro tipos. Entre los inhibidores competitivos se encuentran los iones que también son transportados a través del uniportador, como el  $Sr^{2+}$ , el  $Mn^{2+}$ , el  $Ba^{2+}$ , el  $Fe^{2+}$  y los lantánidos. Existe otro grupo de inhibidores que está formado por cationes como el  $Mg^{2+}$ , las poliaminas, los protones, que a pesar de no ser transportados por el uniportador, interfieren en el proceso del transporte de  $Ca^{2+}$  por unión o por apantallamiento de cargas. El tercer grupo de inhibidores lo componen policationes como el rojo de rutenio y la hexamina de cobalto (Tashmukhamedov y cols., 1972). Estos inhibidores son muy potentes y presentan una baja constante de inhibición ( $K_i$ ). 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  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los lantánidos se transportan muy lentamente a través del uniportador, por lo que pueden ser utilizados como inhibidores competitivos efectivos (Vaino y cols., 1970). A partir de los datos de inhibición del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  se ha calculado que existe un máximo de 0.001 nmol/mg de sitios de transporte sensibles a lantano en la membrana interna mitocondrial (Vaino y cols., 1970). Este dato representa uno de los estimados más confiables del número de acarreadores de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria.

La inhibición del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$ , especialmente en mitocondrias de corazón (Vaino y cols., 1970), se revierte parcialmente por  $\text{Mn}^{2+}$  (Allshire y cols., 1985). El cadmio es otro catión que inhibe competitivamente el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (Chávez y cols., 1985). El efecto del cadmio se previene con ditiotreitól, lo cual indica que el cadmio entra a la mitocondria e interactúa con algún grupo sulfhidrilo en la membrana, el cual es esencial para la translocación del  $\text{Ca}^{2+}$  (Chávez y cols., 1985). Las poliaminas espermina y espermidina inhiben el transporte de manera similar al  $\text{Mg}^{2+}$ , con una  $K_i$  de 180  $\mu\text{M}$  (Åkerman, 1977; Lenzen y cols., 1992); sin embargo, a bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  dichas poliaminas activan el transporte con una  $K_{0.5}$  de 50  $\mu\text{M}$  en lugar de inhibirlo (Lenzen y cols., 1992). La inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$  o por poliaminas

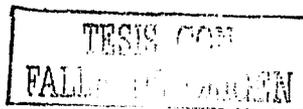


puede ser debida a la unión de estos agentes cerca del sitio de transporte o por efectos de apantallamiento de cargas.

El inhibidor más utilizado en el estudio del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial ha sido el polication rojo de rutenio (Rossi y cols., 1973). El rojo de rutenio es un compuesto inorgánico producto de la síntesis química en el laboratorio y que no se encuentra en la naturaleza. El rojo de rutenio fue descrito por primera vez por Joly en 1892 y desde entonces se ha investigado ampliamente con el fin de conocer un poco más de sus propiedades.

#### **Purificación del uniportador mitocondrial de calcio.**

Se han hecho múltiples intentos por purificar el acarreador mitocondrial de calcio (Lehninger 1971, Sottocasa y cols., 1971, Gómez-Poyou 1972, Blondin 1974, Carafoli y Sottocasa 1974, Jeng y Shamoo 1980, Mironova y cols. 1982 y Ying y cols. 1991). Sin embargo, es difícil hacer una evaluación inequívoca de las diferentes preparaciones mitocondriales que han sido asociadas a este uniportador, ya que su actividad ionofórica no ha sido ensayada en los mismos sistemas experimentales.

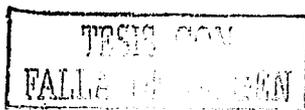


## **A. Los primeros intentos**

Reynafarje y Lenhinger ( 1969) sugirieron que el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  podría ser aislado en forma soluble; así que Lenhinger en 1971 separó una fracción a partir de mitocondrias sometidas a un choque osmótico. Esta fracción contenía sitios de unión a calcio de alta afinidad y baja afinidad. La constante del sitio de alta afinidad fue un poco mayor a la constante calculada para mitocondrias completas.

La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a esta fracción no se inhibió por magnesio ni por desacoplantes. Se especuló que el peso molecular de la partícula responsable de la unión debía de exceder los 150 kDa , ya que sólo era retardada en una columna de sephadex G-200 y no en columnas de G-100 o G-50.

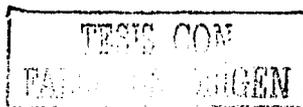
Gómez-Puyou y cols. (1972) intentaron purificar el factor que une a  $\text{Ca}^{2+}$  con gran afinidad a partir del extracto acuoso de Lenhinger. Con respecto a la preparación inicial se calculó que el factor de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  fue purificado de 50 a 100 veces. El factor contenía tanto sitios de baja afinidad ( $K_d$  500  $\mu\text{M}$  y  $B_{\text{max}}$  de 900 nmol/mg de proteína ), como sitios de alta afinidad ( $K_d$  0.7-4  $\mu\text{M}$  y  $B_{\text{max}}$  48-70 nmol/mg de proteína); cuya actividad no era inhibida por desacoplantes ni por inhibidores de la respiración. Esta fracción se componía de una proteína de 67 kDa y cuatro proteínas menores. Este extracto se convirtió en insoluble después de un proceso de diálisis , lo cual de alguna manera impidió un



proceso de purificación más fino. Se analizó su composición, obteniéndose 1- 1.2 nmol de ácido siálico por miligramo de proteína, lo cual corresponde a 0.2-2% de los sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que se especuló que el ácido siálico no intervenía en el proceso de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **B. Evidencia de glicoproteínas en la mitocondria.**

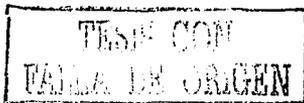
Moore (1971) sugirió que la insolubilidad del factor aislado por el grupo del Lehninger, era indicativo de que este extracto contenía pequeños fragmentos mitocondriales que precipitaban a bajas concentraciones de sal, probablemente fragmentos que contenían carbohidratos. Este mismo autor, conociendo la observación hecha por Bondareff (1970), de que las mitocondrias se tiñen con el colorante de mucopolisacáridos rojo de rutenio (Gustafson y Pihl, 1967 y Luft 1965), y sabiendo que los grupos sulfatos y carboxilos de los mucopolisacáridos son buenos candidatos para unir  $\text{Ca}^{2+}$ , estudió el efecto de este colorante en la unión y el transporte de calcio. El rojo de rutenio, a una concentración de 12  $\mu\text{M}$ , impide que el calcio estimule la respiración mitocondrial, sin inhibir la respiración estimulada por ADP o valinomicina. Calculó que se unen aproximadamente 0.35 nmol de rojo de rutenio por mg de proteína, lo que representa el 25-30% del valor



estimado por Lehninger (1969) para sitios de unión de alta afinidad. Dichos estudios de inhibición, aunados a las evidencias de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a sitios de alta afinidad, establecieron que la molécula responsable de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias es una proteína. El trabajo de Moore puso también de manifiesto la relación entre los carbohidratos y el rojo de rutenio, asimismo sugirió la naturaleza glicoproteica de esta proteína.

El grupo de Bernard y colaboradores (1971) estudiaron la presencia de glicoproteínas en la mitocondria y encontraron que aproximadamente el 80% del material que contiene carbohidratos en las mitocondrias se libera en forma soluble y que ambas membranas contienen estas moléculas asociadas probablemente a macromoléculas.

Bosman y Martín (1969), conociendo la presencia de glicoproteínas en las mitocondrias (Brunngraber y Brown 1963, 1964), investigaron la capacidad de la mitocondria para incorporar monosacáridos a proteínas, encontrando que las mitocondrias aisladas son capaces de incorporar estas moléculas (fructosa, manosa, glucosa y galactosa), a partir de carbohidratos unidos a núcleos de difosfato, proceso para el cual no es necesario que las mitocondrias se encuentren íntegras. Localizaron monosacáridos en la membrana interna mitocondrial, mismo compartimiento en el que se observó la



incorporación de leucina marcada, lo que sugería que las proteínas que incorporaron tanto la leucina como el residuo glicosídico eran muy similares a las que se sintetizan en la mitocondria *in vivo*; por lo que se concluyó que la mitocondria es capaz de sintetizar glicoproteínas e incorporar residuos de carbohidratos en su membrana interna. Se sabe también que la membrana interna y la externa de la mitocondria contienen sistemas de síntesis de N-glicoconjugados a través de la vía del dolicolpírofosfato (Levrat y cols., 1989); la membrana Interna además es capaz de transferir azúcares unidos a nucleótidos a aceptores proteicos (Levrat y cols. 1990).

### **C. Purificación de una glicoproteína mitocondrial asociada a movimientos de calcio.**

Sottocasa y cols. (1971) describieron la purificación de una glicoproteína localizada en el espacio intermembranal. La fracción soluble recuperada contenía una serie de proteínas, las cuales se detectaron en un gel de poliacrilamida. Entre las proteínas obtenidas destaca una banda de 51 kDa, correspondiente al 20% de la proteína del extracto acuoso. Dicha proteína reacciona positivamente con el reactivo de Schiff, con toluidina, con azul alciano y rojo de rutenio, lo que denota su naturaleza glicoproteica. Sin embargo, en cuanto a su

relación con el uniportador, la cantidad de glicoproteína obtenida contrasta claramente con el número de acarreadores calculados por Reed y Bygrave (1972).

Posteriormente se determinó que la banda predominante de 51 kDa estaba compuesta por varias proteínas, incluyendo a una glicoproteína. Esta última fue separada por un sistema combinado de electroforesis preparativa. La glicoproteína también pudo ser purificada sometiendo a las mitocondrias a un proceso de sonicación, lo que hace suponer que esta glicoproteína se distribuye entre la membrana interna y el espacio intermembranal, o bien se encuentra expuesta en la cara interna de la membrana interna mitocondrial.

Sottocasa y cols., (1972) purificaron una glicoproteína de 42 kDa a partir de mitocondrias de hígado de bovino. La glicoproteína contenía cantidades variables de calcio y magnesio unido ( hasta 400 mol/mg) Por lo que toca a su capacidad para unir  $\text{Ca}^{2+}$ , se observaron dos componentes con distintas afinidades: el componente de alta afinidad unía hasta 72 nmol  $\text{Ca}^{2+}$  /mg, mientras que el de baja afinidad unía hasta 600 nmol  $\text{Ca}^{2+}$  /mg con una constante de disociación de 10  $\mu\text{M}$ . Los inhibidores de la respiración mitocondrial, así como los desacoplantes no afectaron el proceso de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a esta preparación. Ya que el peso molecular de la proteína fue de 42 kDa, se calculó que un mol de proteína unía aproximadamente tres moles de

$\text{Ca}^{2+}$  con gran afinidad. Por otro lado, la glicoproteína aislada correspondió al 1% de la proteína total, y por tanto constituiría toda la capacidad de la mitocondria para unir  $\text{Ca}^{2+}$ .

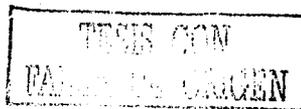
Para establecer si dicha proteína participa en movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  se reconstituyó en un sistema de bicapas lipídicas (Sottocasa y cols., 1972), encontrándose una disminución de la resistencia eléctrica solo en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y de manera sensible a rojo de rutenio (Prestipino y cols., 1974).

Por su parte, Sandri y cols (1976) estudiaron la liberación de la glicoproteína hacia el medio, después de someter a la mitocondrias a un choque osmótico. La cantidad de glicoproteína fue estimada por medidas densitométricas en geles de poliacrilamida, y se determinó que la cantidad de proteína liberada en ausencia de calcio era el doble de la liberada en presencia del catión. Además, el EDTA un quelante de cationes, fue capaz de extraer también a dicha proteína, sin embargo, el EGTA no fue capaz de liberar a la glicoproteína. Por lo anterior los autores atribuyeron al magnesio un papel en la asociación de la glicoproteína a la membrana.

Algunos de los acarreadores mitocondriales se han podido purificar como simples preparaciones proteicas con base en su peso molecular, después de una solubilización con detergente o solventes orgánicos

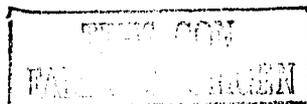
(Weihsua y cols., 1992). También se han utilizado técnicas inmunológicas para identificar a dichos acarreadores. Mironova y cols. (1982), describieron una glicoproteína mitocondrial de 40 kDa y un péptido de 3 kDa utilizando estas técnicas. El método de purificación incluyó una separación por exclusión molecular en cromatografía en gel después de una extracción orgánica con etanol. La capacidad ionofórica se evaluó en bicapas planas en presencia de 12 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Dos de las fracciones fueron capaces de mediar el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ . A partir de una de ellas se purificó una glicoproteína de 40 kDa, y de la otra fracción se aisló un péptido de 3 kDa. El tratamiento con acetona no separó los carbohidratos de la glicoproteína, lo que sí ocurre con otras preparaciones glicoproteicas ( Panfilii y cols., 1976); esto es indicativo de que el residuo glicosídico se encuentra fuertemente unido a la proteína. La capacidad ionofórica de la fracción no disminuyó después de delipidarla, ni tampoco su sensibilidad al rojo de rutenio, sin embargo, después del tratamiento con una proteasa, la actividad de la glicoproteína se perdió totalmente. Por otro lado, los reactivos que unen a grupos tioles abatieron la actividad, tanto de la glicoproteína, como del péptido, mientras que el ditiotretitol restauró la actividad de ambos factores.

Los anticuerpos preparados contra la glicoproteína de 40 kDa inhibieron el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitoplastos ( Saris y cols., 1993) y 0.5



mM de espermina evitó en cierto grado, dicha inhibición. Sin embargo, los anticuerpos que reconocieron la glicoproteína aislada por Minorova y colaboradores (1982) no reaccionaron con la glicoproteína aislada por el grupo de Sottocasa y cols. (1972) y no fueron específicos ni de órgano ni de especie (Dolgachova y Scarpa 1984), además de que reaccionaron específicamente en una preparación de fibroblastos y no en mitocondrias.

En 1994 el grupo de Minorova purificó aún más el péptido de 3 kDa. El péptido formaba canales selectivos para  $\text{Ca}^{2+}$ , inhibibles por rojo de rutenio, así como con el tratamiento con proteasas. En estos ensayos en bicapas planas se utilizaron concentraciones de calcio relativamente altas (mM), por lo que no se puede saber qué tan específica para  $\text{Ca}^{2+}$  es esta preparación. Este péptido también se reconstituyó en un sistema de proteoliposomas, calculándose así una  $K_m$  para  $\text{Ca}^{2+}$  de 20  $\mu\text{M}$  y una  $I_{50}$  para el rojo de rutenio de 2-3 nM (Minorova y cols. 1994). Ya que el péptido se purificó a partir de la preparación glicoproteína-péptido, este grupo sugirió que el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  comprende más de un componente. La glicoproteína sólo contiene los sitios de alta afinidad para  $\text{Ca}^{2+}$  y se desconoce qué tipo de sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  se presentan en el péptido, los autores supusieron que contiene los sitios de baja afinidad (Utesheva y cols., 1989), idea que es apoyada por el



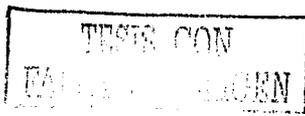
hecho de que los ensayos de transporte con el péptido necesitan mucho más  $\text{Ca}^{2+}$  que el complejo glicoproteína-péptido.

A pesar de los estudios antes mencionados, no puede afirmarse que la preparación de Minorova y su grupo (1984) contenga al uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que existe evidencia de que la glicoproteína es un contaminante citoplásmico, debido a que su secuencia del extremo amino terminal es muy similar a la de la proteína plasmática orosomucoide (Minorova y cols. 1994).

Así, sobre la información generada años atrás, se mantiene la interrogante de si las preparaciones mitocondriales utilizadas en las investigaciones donde se reportan glicoproteínas son totalmente puras. Una vez definida esta selección se podrá establecer si las mitocondrias pueden contener glicoproteínas y si alguna de estas está relacionada con el uniportador de calcio mitocondrial.

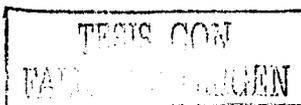
En el presente trabajo de tesis, para evitar cualquier tipo de contaminación en nuestras preparaciones mitocondriales modificamos el método de obtención de las mitocondrias por centrifugación diferencial, utilizando gradientes discontinuos de densidad durante los últimos pasos de extracción.

A diferencia de muchos grupos de investigación, en los cuales se ha hecho la identificación de glicoproteínas utilizando métodos colorimétricos, nosotros identificamos a las glicoproteínas usando



anticuerpos que reconocen en las glicoproteínas de nuestras fracciones.

En este trabajo proponemos que, de ser el uniportador de calcio una glicoproteína, al modificar los residuos glicosídicos enzimáticamente, obtendremos cambios en la actividad del transportador mitocondrial ó , dada la relación que se ha establecido entre el rojo de rutenio y los compuestos glicosilados, cambios en el poder inhibitorio de este compuesto policationico sobre el transporte de calcio, lo que sugeriría la presencia de residuos glicosídicos como parte de la estructura del uniportador de calcio mitocondrial.



## **OBJETIVO GENERAL:**

- Determinar la presencia de residuos glicosídicos en el uniportador de calcio mitocondrial

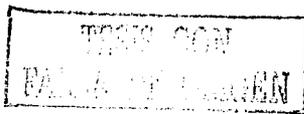
## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Obtener fracciones mitocondriales puras, a partir de centrifugación diferencial en gradientes discontinuos de percoll.
- Definir la pureza de las fracciones mitocondriales, midiendo la actividad de enzimas marcadoras propias de los diferentes organelos celulares.
- Detectar la presencia de glicoproteínas mediante el uso de anticuerpos que reconocen haptenos unidos específicamente a estas proteínas.
- Determinar en qué region de la mitocondria se encuentran las glicoproteínas.
- Analizar mediante la acción de glicosidasas específicas, el efecto de remoción de los residuos glicosídicos sobre el transporte de calcio en la mitocondria y en mitoplastos.
- Analizar la relación entre la presencia de los residuos glicosídicos y la inhibición con el compuesto rojo de rutenio y Rutenio 360.



## **HIPÓTESIS**

Si al modificar los residuos glicosídicos de una fracción mitocondrial observamos un cambio en la capacidad de los complejos policatiónicos de rutenio para inhibir el transporte de calcio, entonces demostraremos la presencia de residuos glicosídicos asociados al uniportador de calcio.



## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

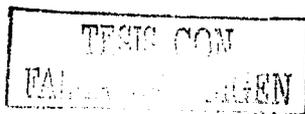
### **Preparación de mitocondrias**

Para la obtención de mitocondrias se utilizaron riñones de ratas Wistar de 250 g, los cuales se depositaron en un medio frío de sacarosa 250 mM, TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.3. Con este mismo medio se lavaron para eliminar tejido grasoso, posteriormente se cortaron en pequeños trozos y se homogenizaron. El homogenado se centrifugó a 2500 RPM durante 10 min. Del que se recuperó el sobrenadante, que fue nuevamente centrifugado a 10 000 RPM durante 10 min; como resultado de esta centrifugación se recuperaron las pastillas que se resuspendieron con sacarosa 250 mM, TRIS 10 mM y se centrifugaron a 10 000 RPM durante 10min, se resuspendieron las pastillas con 1ml (aprox) del medio antes descrito y con 0.2% de BSA (Chávez y cols., 1985). Se cuantificó proteína por el método de Lowry (Lowry 1951).

### **Preparación de fracciones mitocondriales:**

#### **Purificación por gradientes de percoll:**

Una cantidad de 80 mg de mitocondrias se aplicaron a un gradiente continuo de Percoll de 25 a 40%. Se disolvió el Percoll en sacarosa 250 mM, TRIS 10 mM pH 7.3 y se formó el gradiente con ayuda de una bomba peristáltica el volumen final fue de la mezcla fue de 10ml, esta preparación (el gradiente de percoll y las mitocondrias) se centrifugó a



18 000 RPM por 15min. Las zonas del gradiente ricas en mitocondrias se colectaron y se centrifugaron a 10 000 RPM durante 10 minutos utilizando sacarosa 250 mM , TRIS 10 mM para resuspender el pellet (1ml aprox.). Finalmente se cuantificó proteína de cada fracción por el método de Lowry (Lowry 1951).

Obtención de mitoplastos:

La membrana externa de las mitocondrias se rompió con 0.06 mg digitonina/mg de proteína durante 15 minutos a 4 °C . Se centrifugo a 10 000 rpm, se obtuvo los mitoplastos en la pastilla y la membrana externa en el sobrenadante. Para la obtención de los otros compartimentos mitocondriales, los mitoplastos se rompieron con lubrol, incubándolos a una concentración de 0.16 mg/mg de proteína por 10 minutos en frío. Se centrifugo a 50 000 rpm por 30 minutos obteniéndose en el sobrenadante proteínas de matriz y en la pastilla proteínas de membrana interna. Se cuantificó proteína por el método de Lowry (Lowry 1951).

TRIS CON  
FALTA DE CARIEN

### Obtención de la fracción semipurificada del uniportador de calcio

(F90):

Una cantidad de 150 mg de partículas submitocondriales (obtenidas por el método de Lee y Ernster, 1965), 6 ml de colato de sodio al 5% y 25 ml de Sacarosa 250 mM y TRIS 10 mM pH 7.3, se agitaron en frío por 30 min. La mezcla se centrifugó a 45 000 rpm por 45 min. El sobrenadante se saturó con 50% de sulfato de amonio en agitación por 30 min. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 min. El sobrenadante se dializó contra TRIS 50 mM toda la noche (Zazueta y cols.,1994). Se cuantificó proteína por el método de Lowry (Lowry 1951).

### Medición de enzimas marcadoras para diferentes organelos.

Fosfatasa ácida: Esta hidroliza al grupo fosfato del p-nitrofenil fosfato produciendo p-nitrofenol:



Funciona a valores de pH ácidos y se localiza principalmente en **lisosomas**. Se preparó una mezcla de reacción de p-nitrofenil fosfato 16 mM (sustrato) y acetato de sodio 180 mM/acético pH 5.0

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

(amortiguador) en una proporción de 1:1 en tubos eppendorf, tantos como el número de fracciones, así como un duplicado de cada fracción y un blanco. A cada tubo se le agregó 0.2 ml de la solución de reacción y se adicionaron 5  $\mu$ g de cada fracción (en el caso del blanco se compensó el volumen con amortiguador). Los tubos se incubaron a 37° C durante 30 min , se detuvo la reacción con 0.6 ml de NaOH 0.25 M y se centrifugaron a 10 000 rpm en una microfuga durante 1 min. Se leyeron los tubos en un espectrofotómetro a 410 nm. ( $\epsilon$ =p-nitrofenol 9620 M/cm) (Schnaintman y cols.,1968).

Fosfatasa alcalina: Esta fosfatasa actúa a pH básicos. La actividad se localiza en la **membrana plasmática**. Se utilizó p-nitrofenil fosfato como sustrato para producir p-nitrofenol . Se ocupó una mezcla de reacción que contenía p-nitrofenol fosfato y borato de sodio 50 mM-NaOH pH 9.8 , en una proporción de 1:1 (v:v), con 20  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> por cada 10 ml de la muestra de reacción y 5  $\mu$ g de cada fracción mitocondrial. Se colocaron 0.2 ml de la mezcla de reacción en tubos eppendorf según el número de fracciones ; todos los tubos se incubaron durante 30 min, a una temperatura de 37° C , la reacción se detuvo utilizando 0.6 ml de NaOH 0.25 M ; se centrifugaron los tubos en una microfuga durante 1 min a 10 000 rpm y posteriormente se leyeron a 410 nm en un espectrofotómetro ( Schnaintman y cols.,1968).

Glucosa 6-fosfato-fosfatasa: Cataliza la reacción:



Se encuentra localizada principalmente en **retículo endoplásmico**. Para medir esta actividad se preparó en tubos nuevos una solución de reacción con glucosa 6-fosfato (sal de sodio) 0.1 M, un amortiguador de histidina 35 mM y EDTA 10 mM en una proporción de 2.5:1:1 (v:v:v); así mismo se preparó un control negativo únicamente con histidina 35 mM y EDTA 10 mM en una proporción 3.5:1 (v:v). Se prepararon tubos por duplicado de cada fracción con 0.45 ml de la solución de reacción y 50 µg de muestra de cada fracción mitocondrial; los tubos se incubaron durante 30 min a 37° C, se detuvo la reacción con 2.5 ml de TCA y se dejó en hielo durante 20 min. Se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 10 min. Se tomó 1 ml del sobrenadante y se le agregó 1 ml de agua así como 0.25 ml de molibdato de amonio 2.5% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 M y 0.1 ml de solución reductora (0.5 g de 1-amino-2-naftol-4 ácido sulfúrico, 6 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> anhidro disueltos en 200 ml de NaHSO<sub>3</sub> 15%) a cada tubo. Finalmente se calentaron los tubos en baño María durante 10 min, una vez que estos se enfriaron se tomó lectura en un espectrofotómetro a 820 nm. Para poder cuantificar el P<sub>i</sub> resultado de la reacción se interpolaron los valores de absorbancia contra una curva de P<sub>i</sub> ( Schnaintman y cols.1968).

Catalasa: Cataliza la reacción:  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ , la actividad se encuentra localizada en **peroxisomas** (Cohen G., 1970). Se colocaron 50 µg de cada una de las fracciones mitocondriales (por duplicado) a tubos eppendorf con 40 µl de amortiguador de fosfato 0.01 M pH 7.0, se adicionó 0.5 ml de sustrato (6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 0.01 M de amortiguador de fosfatos pH 7.0), después de un minuto se adicionaron 0.1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 N, para finalizar con 0.7 ml de KMnO<sub>4</sub>, se leyó inmediatamente en un espectrofotómetro a 280 nm.

Citocromo oxidasa: Esta enzima cataliza la oxidación de cuatro moléculas de Citocromo C y la reducción concomitante de una molécula de oxígeno por cuatro electrones:



la actividad sólo se encuentra en **mitocondrias** (Brautigain, D.C., 1978). Se incubó 1 mg de proteína de cada una de las fracciones mitocondriales a 25° C en 2 ml de medio: 25 mM TRIS/acetato pH 7.4; 7 mM ascorbato. Con el oxímetro calibrado a 100% y una velocidad de papel de 2 mm/seg se midió el consumo de oxígeno, se agregó 5 µM de citocromo C, 0.5 µM de antimicina A y 0.25 µM de CCCP. Se hizo un control utilizando cianuro de potasio a una concentración de 1 mM para inhibir a la enzima.

## Ezimas marcadoras para compartimentos mitocondriales

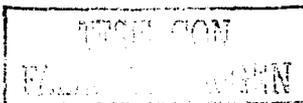
Monoamino oxidasa: Esta enzima se localiza en la membrana externa de la mitocondria, se sigue la formación de benzaldehido ( $\epsilon=1.32 \times 10^4 \text{M/cm}$ ) espectrofotométricamente a 250 nm a 37°C (Schnaintman y cols., 1967) en un sistema de ensayo con 2.4 ml de solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  200 mM + TX100 pH 7.6, con 3.125  $\mu\text{M}$  de benzilamina, se inició la reacción con 0.05 mg de proteína.

Malato deshidrogenasa: Esta enzima se localiza en la matriz mitocondrial, seguimos la siguiente reacción espectrofotométricamente:



en una solución amortiguadora de fosfato de potasio a pH 7.5 (3 ml) con 0.5  $\mu\text{M}$  de oxalacetato, más la adición de 150  $\mu\text{M}$  de NADH. Se inició la reacción con 50  $\mu\text{g}$  de proteína y se leyó la oxidación del NADH a 360 nm a 25°C.

Adenilato cinasa: Esta enzima se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria. Este ensayo se midió espectrofotométricamente a 360 nm a 25°C, siguiendo la reducción de NADP con hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, utilizando el

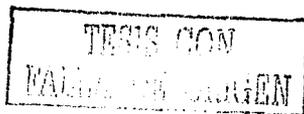


ATP producido por la enzima en presencia de ADP (Schnaitman y cols.,1968). El ensayo se realizó en una cuveta de cuarzo con 3ml de solución amortiguadora de TRIS 0.2M + 0.3% de tween 20 pH 7.3 con las siguientes adiciones: ADP 5 mM, NADP 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, glucosa 1 M. Se inició con 50 µg de proteína.

Citocromo oxidasa: como se mencionó anteriormente esta enzima cataliza la oxidación de cuatro moléculas de citocromo c y la reducción de cuatro moléculas de oxígeno por cuatro electrones (Brautigain,D.C.,1978). se utilizó esta enzima como marcadora de la membrana interna mitocondrial.

#### Acumulación de calcio:

Para esta medición se ocuparon muestras frescas de mitocondrias y/o mitoplastos , se puso un miligramo de proteína en un medio de sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM, succinato 10 mM, fosfato 3 mM, en agitación constante, se tomaron alícuotas de 100 µl a diferentes tiempos, se filtraron con vacío en membranas de nitrocelulosa (0.45µ). La acumulación de calcio se inició con 50 µM de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> con una actividad específica de 600 cpm/nmol. Se lavaron las membranas de



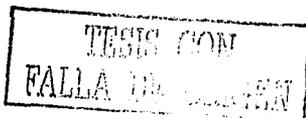
nitrocelulosa con 0.1 M de KCl para retirar la unión inespecífica de calcio. La actividad de las muestras se midió en un contador de centelleo marca Beckman modelo LS 7800 (Zazueta y cols., 1994).

Los ensayos de inhibición del transporte se realizaron en un medio de 125 mM de KCl, 10 mM HEPES, 10 mM succinato y 3 mM de ácido fosfórico pH 7.3, a 25°C a diferentes tiempos y con diferentes concentraciones de los inhibidores (Zazueta y cols., 1999). El rojo de rutenio, el rutenio 360, el lantano y concanavalina A se disolvieron en agua para preparar los Stock.

#### Síntesis del análogo del rojo de rutenio :

##### RUTENIO 360:

Se disolvieron 2.5 mg de cloruro de rutenio, en 0.015 mL de ácido clorhídrico a una concentración de 6 N junto con 0.002 mL de etanol absoluto. Esta mezcla se calentó por 60 minutos a una temperatura de 90 °C, después se adicionaron 0.002 mL de amoniaco concentrado y 0.2 mL de hidróxido de amonio 12 N. Esta mezcla se calentó por 20 minutos a 90 °C, finalmente se incubó 12 horas a 40 °C.



El volumen que se recuperó se pasó por una columna de carboximetilcelulosa que previamente se equilibró con formiato de amonio 0.2 M, pH 5.0. La elución se hizo con un gradiente lineal de concentración de formiato de amonio de 0.2 a 0.6 M. Para finalizar se realizó un espectro donde se seleccionaron aquellos tubos que presentaban un pico de absorbancia a 360 nm. Estos tubos se reunieron en uno solo y se cuantificó la concentración final de rutenio 360 ( $\epsilon = 2.6 \times 10^4$  lt/mol.cm). Para el caso del rutenio 360 marcado radioactivamente se siguió la misma estrategia, solo que se partió de cloruro de rutenio con marca radioactiva.

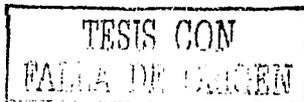
### **Unión de Ru360:**

EN MITOPLASTOS: 100  $\mu$ g de mitoplastos fueron incubados con diferentes concentraciones de rutenio marcado, con una actividad específica de 400 cpm/pmol; en un medio de TRIS 50 mM, KCl 0.1 mM, MgCl 0.1 mM y NaCl 60 mM; pH 7.5 por 10 min. Se agregó 10 mM de rutenio 360 sin marca, finalmente se centrifugó 10000 rpm por diez minutos, se contó la marca radioactiva en un contador de centelleo.

EN LA FRACCIÓN F90: en un gel de acrilamida en gradiente de 12 al 15 %, se corrieron 50 µg de la fracción F90, se incubó el gel con 100 nM de rutenio 360 marcado por 16 hrs. Se hicieron cortes a cada 2.5 mm a lo largo del gel. La radioactividad en los cortes del gel fueron cuantificados en un contador de emisiones gamma (Zazueta y cols., 1999).

### **Detección de proteínas con anticuerpos:**

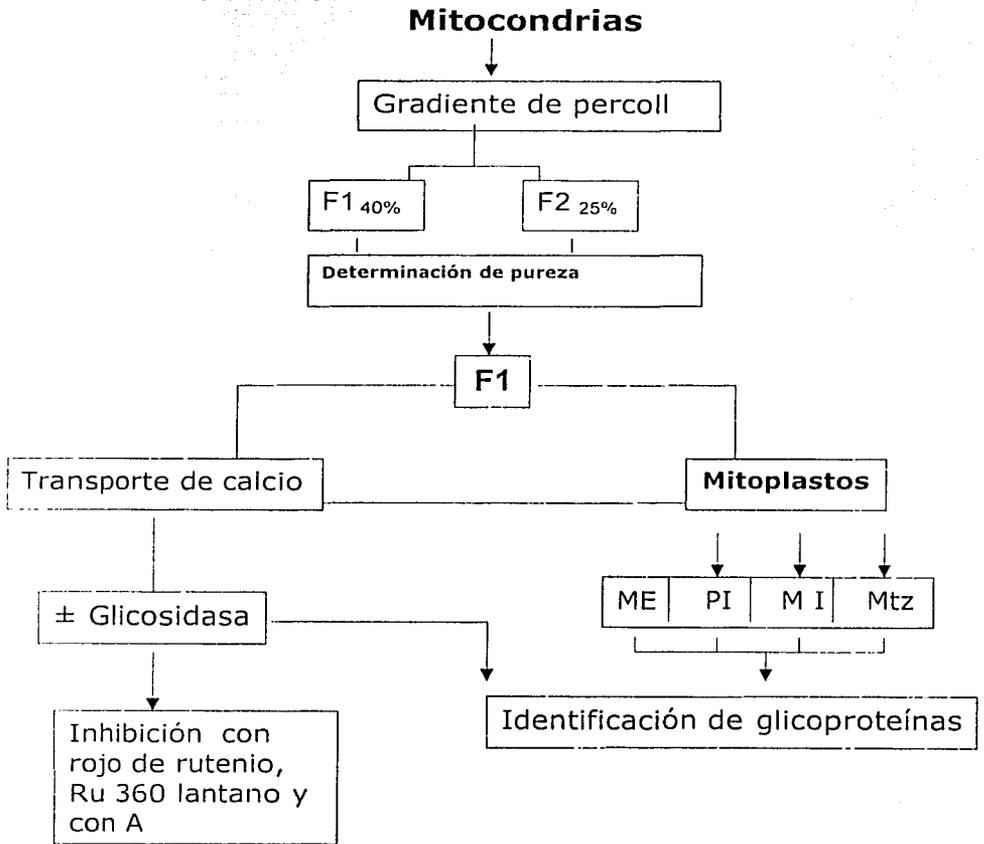
Para la detección de glicoproteínas se utilizaron anticuerpos anti-digoxigenina (Roche). Este hapteno se unió a los grupos aldehído de los azúcares de la proteína. Las muestras se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida en gradiente de 12 al 15 % y se transfirieron a papel de nitrocelulosa para revelarlos con anticuerpos específicos (Western blot). Se emplearon también enzimas para el corte de residuos glicosídicos, para ello se incubó 0.01 U de enzima por cada miligramo de proteína a temperatura ambiente por 30 min. Para obtener mitocondrias libres de lípidos, se hicieron extracciones con una mezcla cloroformo metanol 2:1 (v:v).



### **Desglicosilación de glicoproteínas:**

La enzima N-glicosidasa F (Roche) se utilizó para el corte de residuos glicosídicos, para ello se incubaron 0.01 U de enzima por cada microgramo de proteína según sea el caso, en un medio con 50 mM de fosfato de potasio, 10 mM de EDTA, 0.5% de Tx-100, 0.2 % de SDS, 0.1 %  $\beta$ -mercapto etanol a temperatura ambiente por 30 min. En el caso de los mitoplastos se uso el medio antes descrito sin SDS, las muestras de mitoplastos se lavaron con 250 mM de sacarosa, 10 mM de TRIS pH 7.3 y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos y se recuperó la pastilla en el mismo buffer.

## Estrategia experimental.



## RESULTADOS.

De acuerdo con los objetivos planteados, se probaron diferentes gradientes porcentuales de percoll siendo el más satisfactorios para el aislamiento de las mitocondrias el gradiente continuo de 25% y 40%, en donde se obtuvieron dos regiones de sedimentación, la fracción 1 y 2 . La actividad específica de las enzimas marcadoras evaluadas en dichas fracciones se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Actividad específica de diferentes enzimas marcadoras (n=8)

	Fosfatasa ácida $\mu\text{mol} / \text{mg} /$ $\text{min.}$	Fosfatasa alcalina $\mu\text{mol} / \text{mg} /$ $\text{min.}$	Catalasa $\mu\text{mol} / \text{mg} /$ $\text{min.}$	Glucosa-6- fosfato fosfatasa $\mu\text{mol} / \text{mg} /$ $\text{min.}$	Citocromo oxidasa $\text{nAO} / \text{mg} / \text{min.}$
Fracción 1	<b>3.34</b> $\pm 2.7$	<b>7.59</b> $\pm 3.3$	<b>0.0356</b> $\pm 0.022$	<b>11.90</b> $\pm 5.7$	<b>1327.07</b> $\pm 150$
Fracción 2	<b>1.26</b> $\pm 0.79$	<b>34.75</b> $\pm 6.65$	<b>0.0146</b> $\pm 0.009$	<b>18.97</b> $\pm 8.4$	<b>1227.36</b> $\pm 136$
Mitocondrias	<b>3.22</b> $\pm 1.9$	<b>37.08</b> $\pm 6.7$	<b>0.0238</b> $\pm 0.006$	<b>24.70</b> $\pm 5.9$	<b>1336.87</b> $\pm 105$
Homogenado	<b>2.57</b> $\pm 0.98$	<b>16.99</b> $\pm 7.7$	<b>0.0314</b> $\pm 0.019$	<b>9.29</b> $\pm 3.2$	<b>408.54</b> $\pm 66.4$
	lisosoma	membrana	peroxisoma	reticulo	mitocondria

Los datos del cuadro 1, se procesaron para determinar la actividad total presente en nuestras muestras:

Cuadro 2. Actividad total de diferentes enzimas marcadoras.

	Fosfatasa ácida μmol/min	Fosfatasa alcalina μmol/min	Catalasa μmol/min	Glucosa- 6-fosfato fosfatasa μmol/min	Citocrom o oxidasa nAO/min
Fracción 1	87	192	0.09	301	27,430
Fracción 2	82	509	0.21	480	26,562
Mitocondrias	284	2,860	1.80	1,900	107,323
Homogenado	5,155	33,370	62.5	18,440	464,509

Se calculó la cantidad de actividad remanente presente en cada fracción respecto al homogenado, ésta se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 3. Porcentaje de actividad remanente de diferentes enzimas marcadoras con respecto al homogenado.

	Fosfatasa Ácida	Fosfatasa Alcalina	Catalasa	Glucosa-6-fosfato fosfatasa
Fracción 1	1.7	0.56	0.14	1.63
Fracción 2	1.6	1.50	0.35	2.60
Mitocondrias	5.6	8.5	3.5	10.6

El fraccionamiento mitocondrial con las técnicas descritas dió lugar a la obtención de fracciones enriquecidas de mitoplastos, membrana externa, interna, proteínas intermembranales y de la matriz, todas ellas obtenidas a partir de la fracción I, que es la que presentó menor grado de contaminación por otros organelos celulares, principalmente tomamos en cuenta la aportación de proteínas contaminantes de membrana plasmática.

Se evaluó la actividad de las enzimas marcadoras de los diferentes compartimentos mitocondriales ( cuadro 4).

Cuadro 4. actividad de las enzimas marcadoras de los diferentes compartimentos mitocondriales (n= 9) , AND actividad no detectada.

	Malato Deshidrogenasa nmolNAD/mg/ min	Monoamino Oxidasa nmol/mg/min	Adenilato- Cinasa nmol/NADP/mg/ min	Citocromo oxidasa nAO/mg/min
Membrana Externa	364.25 ± 172.72	<b>2.42</b> ± 0.95	27.11 ± 12.68	AND
Proteínas Intermembranales	613.18 ± 173.58	AND	<b>199.23</b> SD 36.36	AND
Membrana Interna	440.91 ± 176.12	1.24 ± 0.43	41.01 ± 4.1	<b>296.89</b> ± 91.61
Matriz	<b>4 639.42</b> ± 1067.99	0.84 ± 0.1	99.31 ±12.51	23.23 ± 13.02

Como se observa la malato deshidrogenasa que se encuentra típicamente en la matriz, formando parte del conjunto de enzimas solubles, representa el 76% de la fracción mitocondrial que corresponde a la matriz; de igual forma, la adenilato cinasa y la citocromo oxidasa, encuentran su mayor actividad (54% y 93%) en las subfracciones mitocondriales del espacio intermembranal y de la membrana interna, respectivamente. La monoamino oxidasa, que es una enzima típica de la membrana externa, se caracterizó siempre por ser muy lábil, suponemos que debido a esto es que se obtuvieron valores, por debajo de lo reportado. Una vez que se hicieron las pruebas enzimáticas correspondientes a cada subfracción, se procedió a la detección de glicoproteínas con anticuerpos específicos en cada uno de estos compartimentos

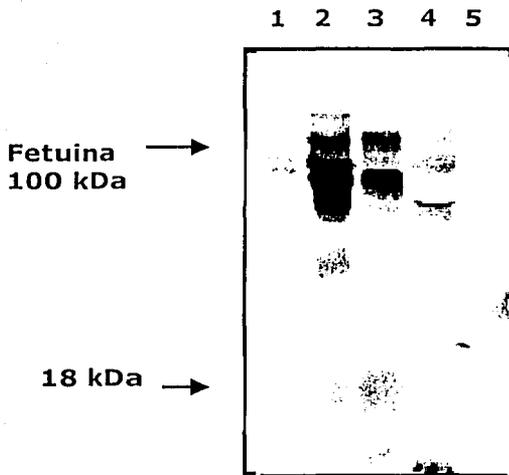


Figura 1. inmunoréplica de Glicoproteínas de las diferentes subfracciones mitocondriales. La cantidad de proteína que se corrió los carriles 2-5 fue de 25  $\mu$ g. El carril 1 corresponde a la glicoproteína fetuina, 2 matriz, 3 membrana interna, 4 espacio intermembranal y 5 membrana externa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la **figura 1** es posible detectar gran variedad de glicoproteínas en cada una de las fracciones; además en cada carril podemos apreciar un bandeo diferente. Es importante mencionar que se obtuvieron a partir de fracciones mitocondriales pasadas por un gradiente de percoll.

En el primer carril de la figura 1 podemos observar el control positivo de fetuina; en el segundo carril se tiene a la fracción enriquecida de matriz mitocondrial, el tercer carril corresponde a la fracción de membrana interna y el cuarto carril es una fracción de proteínas del espacio intermembranal y el quinto carril correspondería a una fracción de membrana externa. Si se observa detenidamente los carriles 3 y 4, podemos notar la clara diferencia tanto en bandas como en pesos moleculares. Aparentemente no se encontraron bandas con el mismo peso molecular, lo que indicaría una contaminación cruzada entre las fracciones. Cabe también mencionar que la mayoría de las glicoproteínas aquí mostradas tienen un peso molecular entre los 60 los y 110 kDa, aunque también se observan algunas proteínas de pesos moleculares menores, pero al estar en menor concentración respecto a las demás, no se alcanza a distinguir como las proteínas de mayor peso molecular. Finalmente en el quinto carril tenemos a la fracción de membrana externa en la que solo podemos observar tres bandas muy

tenues que corresponderían a las glicoproteínas presentes en esta fracción.

De acuerdo con los objetivos planteados, deglicosilamos la fracción de membrana interna, pretendiendo poner de manifiesto la acción de la enzima, así como trasladar las condiciones de deglicosilación a las fracciones de mitoplastos o de mitocondrias, según fuera el caso.

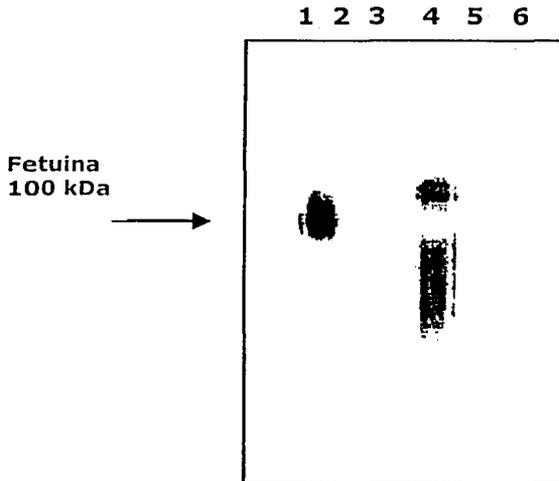


Fig 2. Inmunoréplica de proteínas de membrana interna, 25 $\mu$ g de proteína por carril. Los carriles 3 y 6 fueron incubados con endoglicosidasa H, los carriles 2 y 5 N-glicosidasa F. El carril 1 corresponde al control de fetuina y el 4 corresponde al control de membrana interna.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la **figura 2** se muestra la inmunoréplica de proteínas de membrana interna electrotransferidas. En este experimento comprobamos que las proteínas que reaccionan con el anticuerpo son glicoproteínas, ya que la detección se pierde al remover los residuos glicosídicos. En el primer carril está el control de fetuina, en el segundo carril corresponde a la fetuina tratada con glicosidasa F, en donde se perdió la banda aproximadamente 100 kDa que aparece en el primer carril; el mismo caso es para el tercer carril, donde estaba la fetuina tratada con endoglicosidasa H. El cuarto carril corresponde a un control de una fracción enriquecida de membrana interna mitocondrial que da positivo al ser revelado con los anticuerpos, no así en el caso del quinto y sexto carril, se comprobó el corte del residuo glicosídico por parte de ambas enzimas. Es importante resaltar que se ocuparon dos diferentes enzimas para esta membrana en particular. La N-glicosidasa -F, que corta residuos glicosídicos unidos a una asparagina y la endoglicosidasa H que corta residuos N-glicosídicos ricos en manosa.

En los experimentos anteriores, con las fracciones enriquecidas de los compartimentos mitocondriales identificamos las glicoproteínas presentes en cada uno de ellos, mediante un Western blot. Asimismo, se hicieron controles con fracciones delipidadas para comparar las bandas y tratar de descartar la posibilidad de detectar glicolípidos, la

membrana no mostró diferencia entre el carril con mitocondrias delipidadas respecto al control (datos no mostrados). Una vez que se estableció que lo que se observa en las membranas correspondía a glicoproteínas, se utilizó a la N-glicosidasa F en fracciones purificadas de membrana interna. Este paso fue crucial, pues las condiciones en donde se observa la pérdida de bandas (figura 2), fueron las mismas que se utilizaron para evaluar el transporte de calcio en las mitocondrias y en los mitoplastos.

Se evaluó la acumulación de calcio en las condiciones en las que se hizo la deglicosilación de proteínas mitocondriales, esto es, incubando fracciones de mitocondrias y mitoplastos por 30 minutos en presencia de N-glicosidasa F. Una vez terminado el tiempo de incubación se midió el curso temporal de acumulación de calcio en mitocondrias y mitoplastos. En la **figura 3** se observa que las fracciones tratadas con la glicosidasa no modificaron su transporte respecto a las controles. Esto sugirió que los residuos glicosídicos no modifican la actividad de translocación del calcio hacia el interior de la matriz mitocondrial.

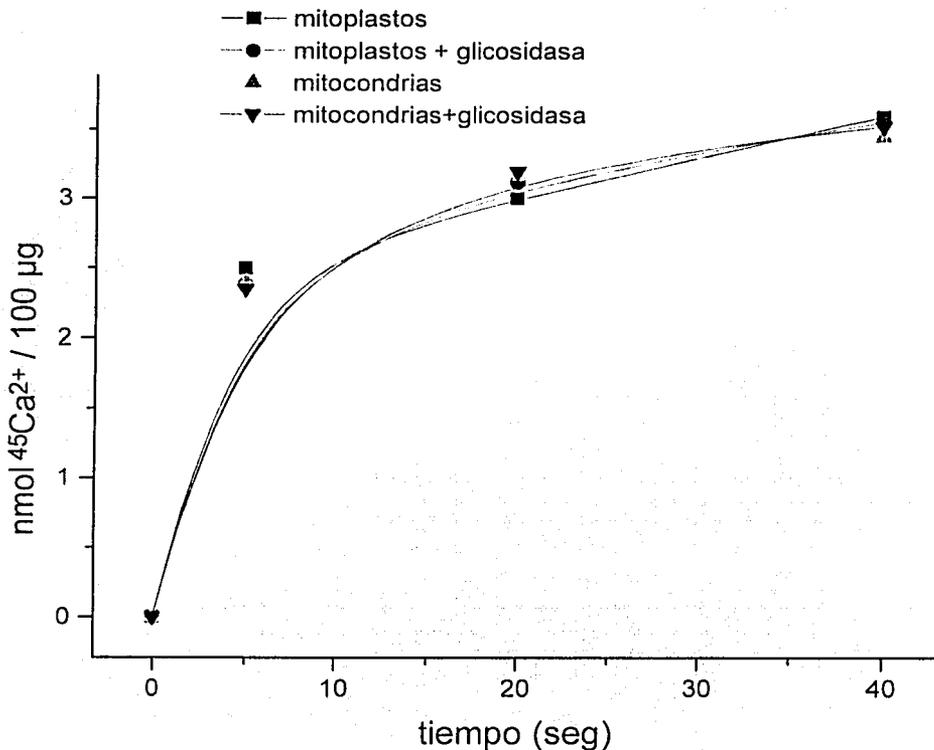
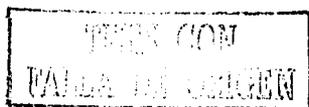


Fig.3 Curso temporal de la entrada de calcio evaluado a tiempos cortos, en condiciones en donde las mitocondrias fueron sometidas a la acción de N-glicosidasa F. Las mitocondrias y los mitoplastos fueron incubados 30 minutos a temperatura ambiente, con 0.01 Unidades de N-glicosidasa F por  $\mu\text{g}$  de proteína total.



Ya que el transporte de calcio no se modificó por la acción de la enzima, se puede sugerir que los residuos glicosídicos no se requieren para el proceso de transporte; sin embargo, se tenía que explorar que es lo que sucede con el transporte en condiciones en las que se usaron alizar rojo de rutenio y su análogo el rutenio 360 como inhibidores.

Para ello, se sometió a fracciones de mitoplastos a la acción de la enzima y se evaluó el efecto inhibitorio tanto del rojo de rutenio como del rutenio 360.

La **figura 4** muestra la inhibición producida por el rojo de rutenio en el transporte de calcio en mitoplastos controles y en mitoplastos que han sido deglicosilados. Con respecto a los controles, se produce una disminución del efecto de rojo de rutenio en las fracciones de mitoplastos tratadas con glicosidasa. Se observa una inhibición casi total del transporte desde 3  $\mu\text{M}$  de rojo de rutenio, mientras que en los que fueron desglicosilados, el transporte solamente disminuye en un 20% a esta concentración. Esto nos habla de la importancia de la presencia de un residuo glicosídico en la estructura molecular del uniportador de calcio para que se lleve a cabo la inhibición por este compuesto.

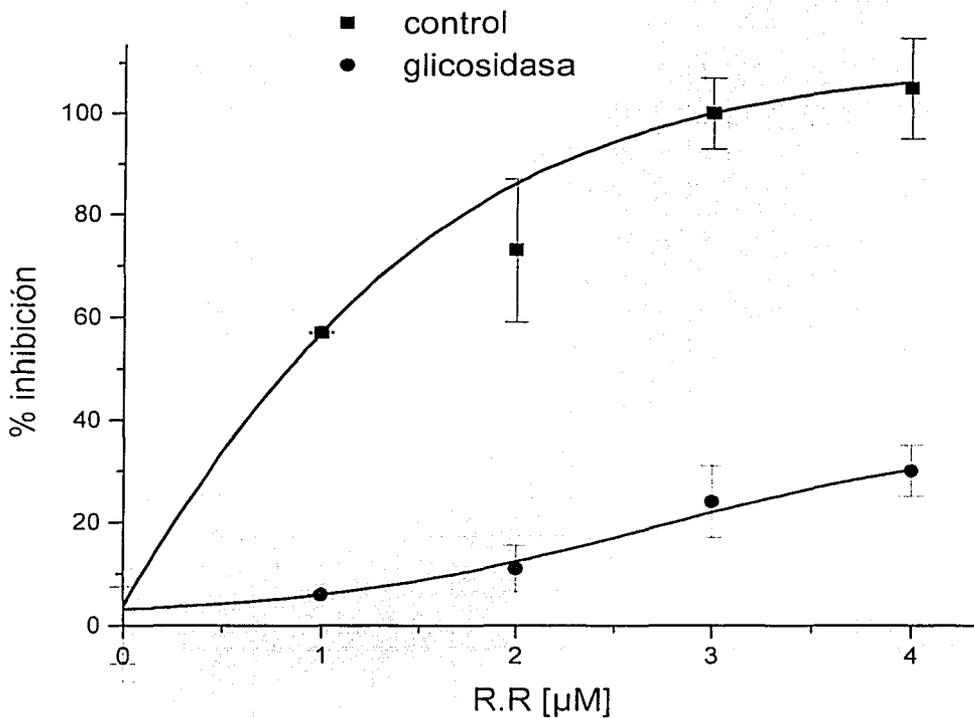


Fig.4 Transporte de calcio a diferentes concentraciones de Rojo de Ruthenio evaluado en condiciones en donde los mitoplastos fueron sometidos a la acción de N-glicosidasa F (n=6). Los mitoplastos fueron incubados 30 minutos a temperatura ambiente, con 0.01 Unidades de N-glicosidasa F por  $\mu\text{g}$  de proteína total.

Es clara la pérdida del poder inhibitorio del rojo de rutenio en el transporte de calcio mitocondrial, por lo que nuestro interés se centró en un potente derivado del rojo de rutenio; el rutenio 360. Se sometieron fracciones de mitoplastos a la acción de la glicosidasa y se evaluó el transporte de calcio en estas condiciones. En la **figura 5** se observa una disminución de la inhibición producida por el rutenio 360 en las fracciones deglicosiladas; a partir de 9 nM de rutenio 360 en el medio de transporte se llega solamente a un 10% de inhibición, producida por este compuesto, mientras que en las fracciones controles se alcanzó el 50% de la inhibición del transporte. Es más evidente la pérdida del poder inhibitorio a concentraciones por arriba de los 15 nM, donde se alcanza casi un 70% de inhibición en las fracciones controles, mientras que en las tratadas con la enzima se observó una inhibición de menos del 20%. Este resultado junto con el obtenido en presencia de rojo de rutenio, ponen de manifiesto la relación entre los residuos glicosídicos como posible parte de la estructura del uniportador de calcio mitocondrial y la sensibilidad a los complejos policationicos de rutenio.

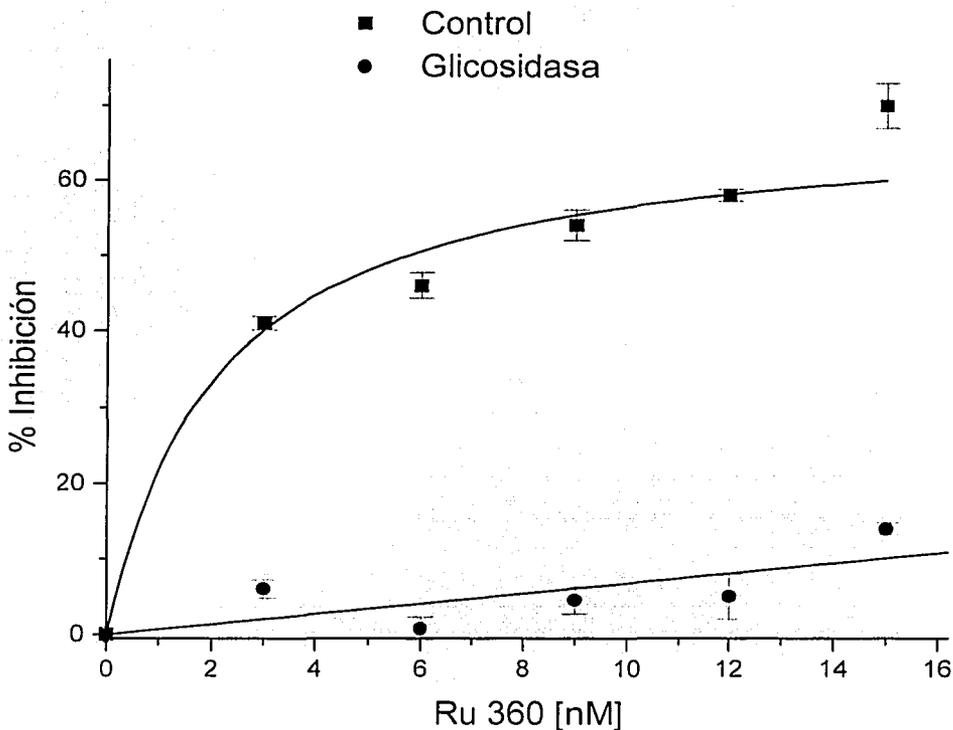


Fig.5 Transporte de calcio a diferentes concentraciones de Rutenio 360, evaluado en condiciones en donde los mitoplastos fueron sometidos a la acción de N-glicosidasa F (n=6). Los mitoplastos fueron incubados 30 minutos a temperatura ambiente, con 0.01 Unidades de N-glicosidasa F por  $\mu\text{g}$  de proteína total.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

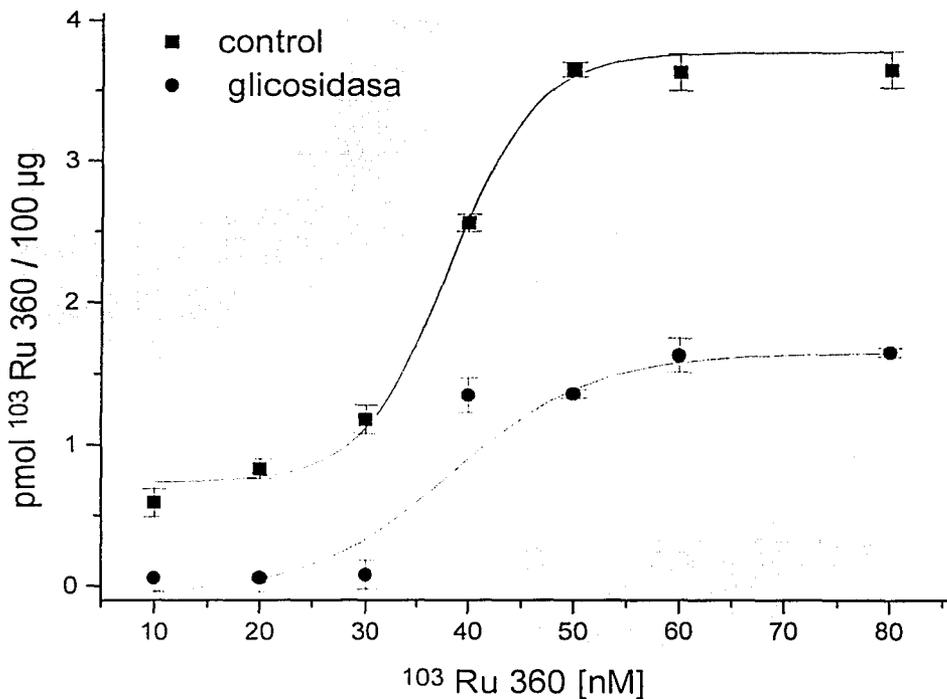


Fig.6 Unión específica de Rutenio 360 a diferentes concentraciones de  $^{103}\text{Ru}$  360, evaluado en condiciones en donde los mitoplastos fueron sometidos a la acción de N-glicosidasa F (n=6). Los mitoplastos fueron incubados 30 minutos a temperatura ambiente, con 0.01 Unidades de N-glicosidasa F por  $\mu\text{g}$  de proteína total.

TESTE CON  
FALLA DE ORIGEN

Para relacionar la inhibición del transporte de calcio por este compuesto con la unión a residuos glicosídicos, se sintetizó el rutenio 360 a partir de su precursor radioactivo el  $^{103}\text{RuCl}_3$ . Se incubaron los mitoplastos controles y deglicosilados con hasta 100 nM de  $^{103}\text{Ru}$  360 por 10 minutos, se centrifugó por 10 minutos a 10 000 rpm, se recuperó el botón y se contó la radioactividad en cada fracción. Se obtuvo así los resultados de la **figura 6**. En donde se observa la unión específica del inhibidor marcado al uniportador. Se observa una clara diferencia en la unión del inhibidor entre las muestras control y las que se sometieron a deglicosilación. En ambas fracciones se observa la presencia de dos componentes, el control se obtuvo una unión de 3.75 pmol Ru360 /100  $\mu\text{g}$  de proteína, mientras que para las fracciones tratadas con la glicosidasa se obtuvo una unión de 1.64 pmol Ru 360 / 100  $\mu\text{g}$  de proteína. Existe una clara correlación entre la unión del complejo radioactivo y la inhibición del transporte.

Con la ventaja de tener una fracción enriquecida, y de contar con el inhibidor marcado radioactivamente, se evaluó a qué proteínas de la fracción purificada se estaba uniendo preferentemente el inhibidor. Para ello, se corrieron muestras de la fracción semipurificada del uniportador en geles de poliacrilamida, se incubó el gel con el inhibidor por 16 horas y se hicieron cortes del mismo a cada 2.5 mm. Se obtuvo un pico

máximo de radioactividad que correspondía a una proteína de alrededor de 20 kDa, lo cual condujo a realizar este mismo experimento pero deglicosilando a la fracción semipurificada de uniportador de calcio. Se obtuvo la imagen de la **figura 7**; en la que el inserto corresponde al gel de la fracción semipurificada antes de los cortes y teñido con azul de Coomassie. Se observa un pico único de radioactividad a una distancia de entre 55 y 60 mm del gel, que corresponde a una proteína de 20 KDa. En la fracción tratada con la glicosidasa no se observa este patrón, lo cual pone de manifiesto el carácter glicosídico de la proteína de 20 KDa; por lo que se puede sugerir que esta proteína forma parte de la estructura del uniportador de calcio y que está relacionada con la unión del inhibidor.

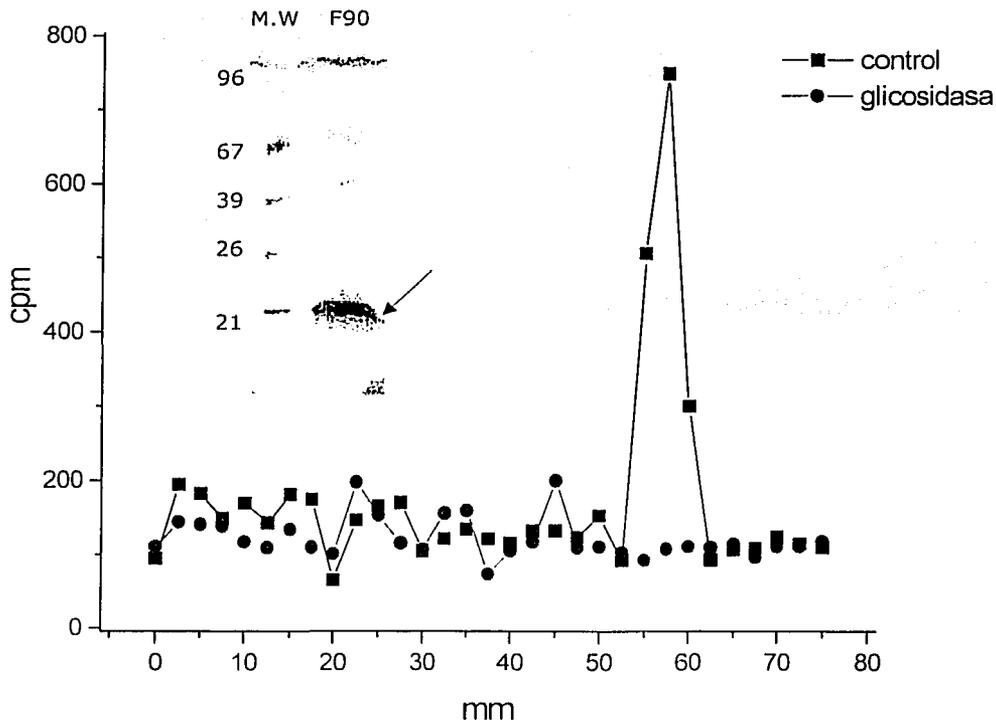


Fig.7 Perfil de incorporación de radioactividad al patron electroforético de una de fracción semipurificada del uniportador de calcio mitocondrial (F90). La fracción semipurificada fue incubada con 100 nM  $^{103}\text{Ru}$  360 por 16 horas en una cámara húmeda. La escala en mm corresponde a los cortes cada 2.5 mm en el gel. La flecha corresponde a la proteína que une la marca radioactiva

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para comprobar que la proteína que une el Ru 360 es una glicoproteína y que se encuentra en la membrana interna mitocondrial, se corrieron muestras purificadas de este compartimiento mitocondrial en geles, y después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. En la **figura 8** se muestra una inmunoréplica de estas fracciones. En el carril 1 se muestra una fracción de membrana interna mitocondrial, obtenida a través del protocolo de purificación descrito. En el carril 2 se muestra una fracción de membrana interna mitocondrial previamente tratada con glicosidasa. Se observa una disminución en la intensidad de bandas en las fracciones deglicosiladas, lo cual se debe a que la enzima está cortando todos los residuos glicosídicos y el sistema de anticuerpos dirigidos contra los carbohidratos presentes en esta fracción no puede detectarlos. Asimismo podemos ver que al menos una proteína de alrededor de 20 kDa desaparece en las muestras tratadas, por lo que proponemos que esta podría ser la misma proteína que une al inhibidor.

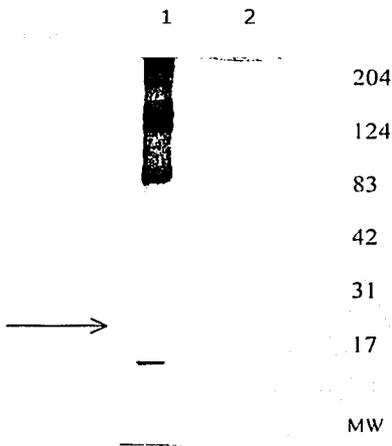


Fig. 8 Inmunoréplica de proteínas de membrana interna mitocondrial tratadas con glicosidasa. La flecha en el carril uno, señala una proteína de 20 KDa que no se observa en el carril dos, por efecto de la N-glicosidasa F (0.01u/ $\mu$ g).

Otros dato que se exploró fue el efecto de las lectinas, en particular la Concanavalina A, sobre el transporte de calcio, ya que las lectinas son poderosas herramientas para el estudio de los carbohidratos, así como para el aislamiento y purificación de glicoproteínas (Glew y cols., 1973 , Rudge & Morphy, 1984 , Martínez-Cruz y cols., 1999).

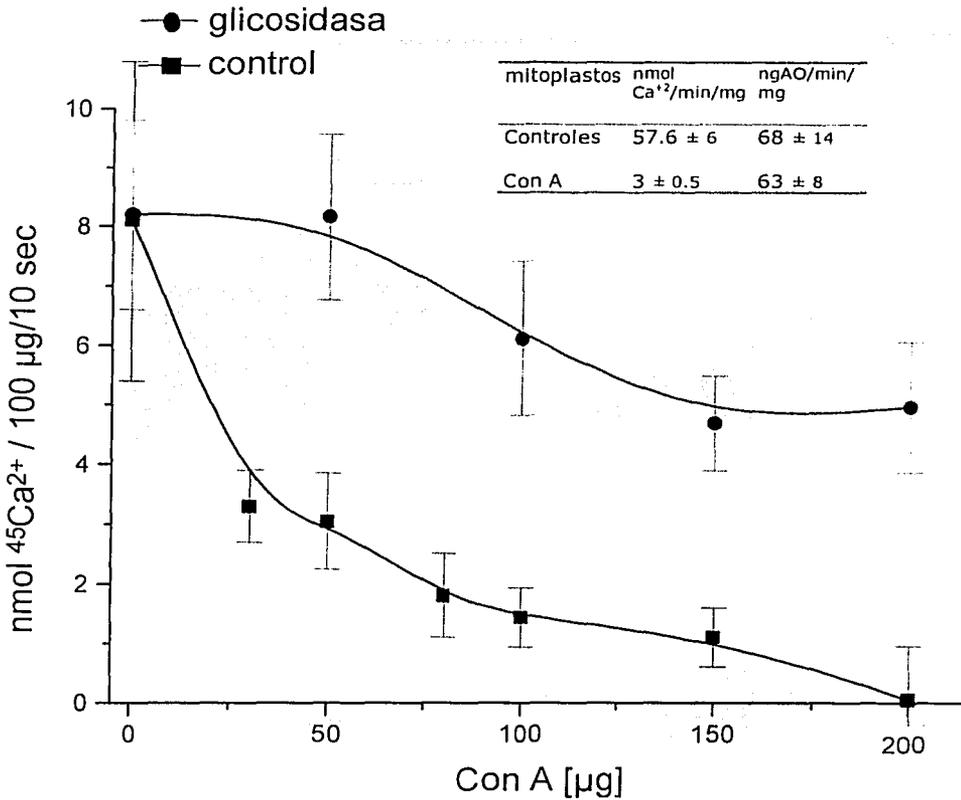


Fig.9 Transporte de calcio en mitoplastos en presencia de diferentes concentraciones de concanavalina A, evaluado en condiciones en donde los mitoplastos fueron sometidas a la acción de N-glicosidasa F (n=3). Los mitoplastos fueron incubados 30 minutos a temperatura ambiente, con 0.01 Unidades de N-glicosidasa F por µg de proteína total. El inserto corresponde al consumo de oxígeno en mitoplastos con 2 mg de concanavalina A en el medio, así como el transporte de calcio en estas condiciones.

TESIS DE  
FALLA DE GREEN

En la **figura 9** se observa que esta lectina actúa a nivel de inhibición del transporte de calcio y no afecta ni la respiración ni el potencial de membrana, es clara la pérdida del poder inhibitorio que ejerce esta lectina en presencia de glicosidasa. Por tanto, es posible sugerir que esta lectina modifica al uniportador de calcio mitocondrial de manera semejante a como lo hace el rojo de rutenio, lo que apoya el carácter glicosídico del uniportador de calcio mitocondrial.

Si la modificación de los residuos glicosídicos en el uniportador de calcio mitocondrial sólo altera la unión de compuestos que tienen afinidad por carbohidratos, la inhibición por otro tipo de inhibidores no debería alterarse.

Un dato interesante fue el efecto del lantano en las fracciones deglicosiladas. A diferencia del rojo de rutenio y el rutenio 360, que presentan una inhibición de tipo no competitiva, el lantano es un inhibidor competitivo, por lo que los sitios de unión al uniportador son muy diferentes.

La **figura 10** muestra la inhibición del transporte de calcio por lantano en fracciones de mitoplastos controles y mitoplastos tratados con la glicosidasa. Tanto las fracciones controles como las deglicosiladas muestran un patrón de inhibición similar, lo cual confirma que tanto el rojo de rutenio como el rutenio 360 se están uniendo a una región glicosídica del uniportador de calcio que no se relaciona con los

sitios de transporte, pero que causan un cambio conformacional en la molécula que impide la translocación de este catión. Esta región podría ser parte del uniportador o alguna proteína accesoria unida al mismo.

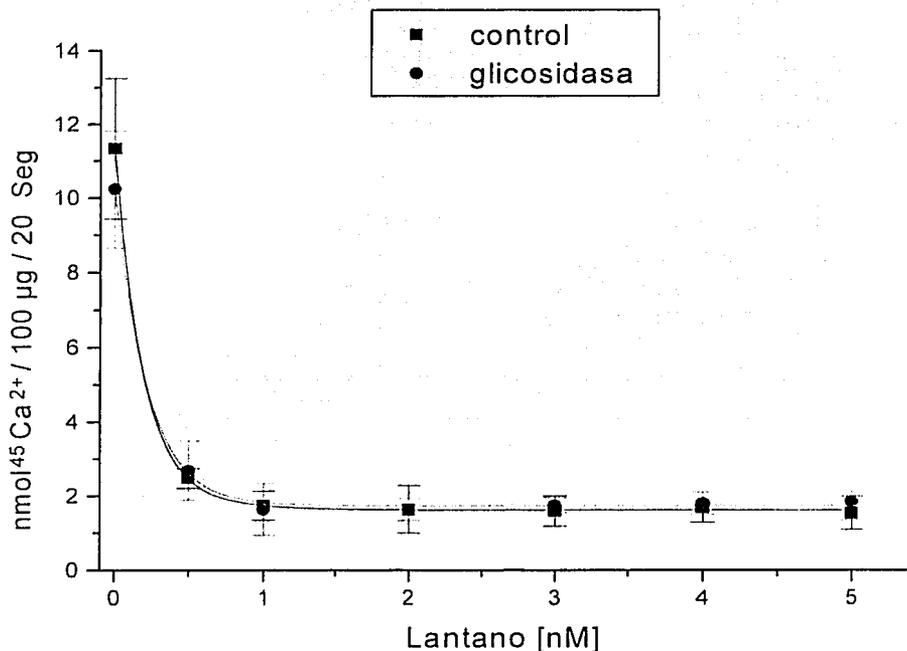


Fig.10 Transporte de calcio en presencia de concentraciones crecientes de lantano. Evaluado en condiciones en donde los mitoplastos fueron sometidos a la acción de N-glicosidasa F (n=4). Los mitoplastos fueron incubados 30 minutos a temperatura ambiente, con 0.01 Unidades de N-glicosidasa F por µg de proteína total.

## **DISCUSIÓN:**

A partir de la centrifugación de las mitocondrias en un gradiente discontinuo de Percoll se obtuvieron dos zonas donde se distribuyen las mitocondrias, lo que corresponde a dos diferentes fracciones. Se tomaron ambas zonas del gradiente de Percoll y se realizaron los ensayos de las diferentes enzimas.

Según el diseño experimental que se utilizó y con los resultados del cuadro 1, encontramos que la mejor fracción para la identificación de glicoproteínas es la que corresponde a la fracción 1, localizada en la zona inferior del gradiente discontinuo de Percoll, en donde se encuentra el mayor número de mitocondrias y las más densas. Los criterios de pureza en que nos basamos para la selección de esta fracción mitocondrial fueron: un bajo porcentaje de contaminación de membrana plasmática y sobre todo de retículo endoplásmico, ya que son los organelos celulares que presentan una mayor cantidad de glicoproteínas en su estructura. La contaminación en nuestras fracciones por parte de lisosomas y de peroxisomas resulta menos crítica, ya que en mitocondrias se ha demostrado actividad de catalasa (Cohen G. 1970., Radi F. 1991).

Este comportamiento se observó en el cuadro 2, donde es evidente una ligera contaminación por lisosomas y peroxisomas en la fracción seleccionada (fracción 1) y que comparada con la fracción 2 es de menos de un 50%. Este resultado no es extraño, ya que se sabe que estos organelos y las mitocondrias tienen densidades semejantes; se ha reportado que en lisosomas existen proteínas que contienen ácido siálico (Okasaki y cols., 1992). Sin embargo, la detección de estos glicoconjugados requiere condiciones de oxidación diferentes a las que se usaron en los experimentos. En cuanto a la contaminación con retículo endoplasmático y membrana plasmática (organelos que cuentan con glicoproteínas en su estructura), se aprecia que la fracción 2 es la más enriquecida con este tipo de contaminante. A partir de estos resultados se seleccionó la población de mitocondrias más densas (fracción 1), con contaminantes de origen lisosomal y peroxisomal, pero con poca contaminación con otro tipo de membranas.

A partir de esta población se obtuvieron los diferentes compartimentos mitocondriales que se utilizaron para detectar glicoproteínas. Se encontró que en la membrana interna mitocondrial, al menos 3 proteínas de 20 kDa, 42 kDa, 81 kDa y proteínas con pesos entre 100 y 200 kDa unen digoxigenina. Esta señal se pierde en casi todas, tras la incubación con la N-glicosidasa F; sin embargo, la

detección del anticuerpo no se pierde por completo , lo cual podría indicar la presencia de azúcares de un tipo diferente al N- unido

Se sabe que la síntesis enzimática de los oligosacáridos de las glicoproteínas de mamífero ocurre en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi y que finalmente son transportadas en vesículas membranosas dirigidas para formar parte estructural de la membrana plasmática (Voet 1996). De ocurrir este fenómeno, ¿cómo es que una glicoproteína llega a la mitocondria?

Se ha sugerido que las mitocondrias no sólo poseen glicoproteínas sino que pueden sintetizarlas mediante glicosiltransferasas específicas (Levrat,C.,Lousiat,P.,1989). En 1992, el grupo de Gasnier purificó una dolicol-fosfato-manosa sintetasa de la membrana externa mitocondrial, que se requiere para la síntesis de dolicol-fosfato manosa, un intermediario en la vía de la manosilación de las cadenas de oligosacáridos. También se ha reportado la incorporación directa de azúcares a partir de nucleótidos a un aceptor proteico de la membrana mitocondrial, que da lugar a una N-glicoproteína con un peso molecular de entre 45 y 63 kDa, susceptible de ser elongada *in vitro* con residuos de N-acetilglucosamina y galactosa (Levrat,C.,Ardail,D.,1990).

Existen varios reportes sobre la presencia de glicoproteínas en las mitocondrias, entre otros estan los trabajos de Bruce en 1970, quien adicionó monosacáridos a preparaciones de mitocondrias y observó su incorporación a glicoproteínas. En 1970, Schachter localizó algunas glicoproteínas en fracciones mitocondriales. Sottocasa localizó y purificó glicoproteínas del espacio intermembranal de las mitocondrias de hígado de rata.

El grupo de Chandra 1991 reportó una glicoproteína de 60 kDa que se origina en aparato de Golgi y que culmina con su anclaje en membrana interna mitocondrial, por la vía de sitios de contacto, que este grupo propone que existen entre la membrana mitocondrial externa e interna. Ya sea ésta la vía que la mitocondria utiliza para la incorporación de glicoproteínas, o bien la síntesis de éstas moléculas en la matriz mitocondrial (Kobata, 1992), el hecho es que se ha encontrado glicoproteínas formando parte de las estructuras membranosas. Nuestros resultados muestran la presencia de proteínas N-glicosiladas asociadas al uniportador de calcio mitocondrial, que podrían estar localizadas en la cara citosólica de la membrana interna y que parecen servir como sitio de reconocimiento para los inhibidores policatiónicos del transporte de entrada de calcio mitocondrial.

Los inhibidores de este tipo utilizados en el presente trabajo presentan un comportamiento no competitivo (Zazueta y cols., 1999), por lo que se concluye que el uniportador de calcio no contiene los residuos glicosídicos y que el uniportador de calcio podría estar interactuando con una molécula accesoria que contiene los residuos glicosídicos, sitio a donde se unen los inhibidores policatiónicos del transportador. Esta idea se hizo mas clara cuando se utiliza un inhibidor de tipo competitivo (lantano). Este ejerce su efecto en el sitio catalítico del uniportador, pero no se observo ningún cambio en la cinética de inhibición cuando las muestras estaban deglicosidadas.

Otros datos que apoyan la propuesta del carácter glicosídico del uniportador de calcio son los que se obtuvieron con la inhibición del transporte de calcio en presencia de concanavalina A. Esta lectina aparentemente actúa reconociendo el mismo sitio de unión a carbohidratos que el rojo de rutenio y el Ru 360. Una vez que la lectina se ancla a ese sitio, causa un cambio conformacional que impide la translocación del calcio hacia el interior de la matriz, pero cuando éste residuo no se encuentra presente, la inhibición no se lleva a cabo. Este mismo fenómeno se reportó para el caso de la actividad de la proteína C, que es una glicoproteína dependiente de vitamina K, donde se observó una pérdida de su actividad anticoagulante al unirse la

concanavalina A a los oligosacáridos de esta proteína (Martínez-Cruz y cols., 1999).

Para relacionar la presencia de residuos glicosídicos con la unión de Ru360 a alguna proteína de membrana interna se utilizó una fracción semipurificada de uniportador de calcio (Zazueta y cols., 1998) y se evaluó cual de las proteínas de la fracción se unía el inhibidor. La asociación entre los residuos glicosídicos y la unión del Ru 360 se relaciona con una proteína de 20 kDa que se ha propuesto que puede formar parte del uniportador de calcio mitocondrial y que está presente en la fracción enriquecida en membrana interna mitocondrial (Zazueta y cols., 1998). Finalmente se propone que esta proteína podría contener los residuos glicosídicos que interactúan con los inhibidores policatiónicos del uniportador de calcio mitocondrial.

## **CONCLUSIONES:**

LOS RESIDUOS GLICOSÍDICOS PRESENTES EN LA ESTRUCTURA DEL UNIORTADOR DE CALCIO SON NECESARIOS PARA LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE PRODUCIDA POR LOS COMPUESTOS POLICATIÓNICOS DE RUTENIO Y LECTINAS.

ESTOS RESIDUOS GLICOSÍDICOS NO ESTÁN INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE TRANSLOCACIÓN DEL CATIÓN HACIA EL INTERIOR DE LA MATRIZ MITOCONDRIAL.

EL UNIORTADOR DE CALCIO PRESENTA EN SU ESTRUCTURA RESIDUOS DE CARBOHIDRATOS.

## BIBLIOGRAFÍA

- Åkerman, K. E. O. ( 1977) " Effects of cation on the temperature sensitivity of  $Ca^{2+}$  transport in rat-liver mitochondria" J. Bioenerg. Biomembr. 9, 141-149.
- Åkerman, K. E. O. ( 1977b) " Effects of Mg and spermine on the kinetics of  $Ca^{2+}$  uptake in rat liver mitochondria" J. Bioenerg. Biomembr. 9, 65-72.
- Allshire, A., Bernardi, P. y Saris N. E. L. (1985) "Manganese stimulates  $Ca^{2+}$  flux through the mitochondrial uniporter" Biochem. Biophys. Acta 807, 202-209.
- Blackshear, P. J. Nairn, A. C. y kuo, J. F. (1988) " Protein kinases 1988: A current perspective" FASEB J. 2, 2957- 2696.
- Blondin, G. (1974) "Isolation of a divalent cation ionophore from beef heart mitochondria" . Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 97-103.
- Bohinski (1991) Bioquímica. Ed Addison-Wesley Iberoamericana. U.S.A. pp 739.
- Bondareff, W. (1970) "Submicroscopic distribution of ruthenium red in human glioblastoma multiforme". J Neurosurg. 32(2),145-51.
- Bosmann, H. B. y Martinss, S. (1969) " Mitochondrial Autonomy". Science. 164, 876-878.

Bragadin, M., Pazzan, T. y Azzone, G. F. (1979) " Kinetics of  $Ca^{2+}$  carrier in rat liver mitochondria" *Biochemistry*. 18, 5972-5978.

Brand, M.D. y Murphy, M. P. (1987) " Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cell" *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 62, 141-193.

Brautigain, D. C. (1978). *Methods in Enzymology*. 53. 128-164.

Brierley, G. P., Davis, M. Y Jung, D. W. (1987) " Respiratory-dependent uptake and extrusion of  $Mg^{+2}$  by isolated heart mitochondria" *Arch. Biochem. Biophys.* 253, 322-332.

Brierly, G. P., Murer, E. y Bachman, E. (1964) " The accumulation of  $Ca^{2+}$  and Pi by heart mitochondria" *Arch. Biochem. Biophys.* 105, 89.

Bruce, B. H. (1970). *Science*. 144, 192-194.

Brunngraber, E. G. y Brow, B. D. (1963) "Preparation of sialomucopolysaccharides from brain mitochondrial ration". *Biochem. Biophys. Acta.* 69, 581.

Bygrave, F. L., Reed, K. C. y Spencer, T. (1971) " Cooperative interaction in energy-dependent accumulation of  $Ca^{2+}$  by isolated rat liver mitochondria" *Nat. New Biol.* 230, 89-91.

Bygrave, F. L. (1977) " Mitochondria calcium transport" *Curr. Top. Bioenerg.* 6, 259-318.

- Bygrave, F. L. y Ash, G. R. (1977) "Development of mitochondrial calcium transport activity in rat liver" FEBS Lett. 80, 271-274.
- Carafoli, E. y Sottocasa, G. (1974) En: Dynamics of energy transducing membranes" Ernsten L. Estabrook y Slayer E.C. Eds. Amsterdarm: Elsevier, pp 455-496.
- Carrondo, M., Griffith, W., Hall, J. y Skalski, A. (1980) "X-ray structure of  $[Ru_3 O_2 (NH_3)_{14}]^{6+}$ , cation of the cytological reagent Ruthenium Red". Biochem. Biophys. Acta. 627, 332-334.
- Chance, B. (1965) "The energy-linked reaction of calcium with mitochondria" J. Biol. Chem. 240 , 2729-2748.
- Chandra, N. C., Spiro, M. J. y Spiro, R. G. (1998) "Identification of a glycoprotein from rat liver mitochondria inner membrane and demostration of its origin in the endoplasmic reticulum". J. Biol Chem. 273, 19715-19721.
- Chapell, J. B., Cohn, M. y Greville, G. D. (1963) en "Energy linked function of mitochondria" edited by B. Chance. New York, Academic Press pp. 219-231.
- Chávez, E., Briones, R., Michelle, B., Bravo C., Y Jay, D. (1985) "Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium uniporter: Studies with cadmium" Arch. Biochem. Biophys. 242, 493-497.

Cohen, G. (1970) "Measurement of catalase activity in tissue extracts".

Anal. Biochem. 34, 30-38.

Conn.(1996).Bioquímica Fundamental. Ed. Limusa: Mexico. pp874.

Cooper, R. H. Randle, P. J. y Denton, R. M. (1974) " Regulation of heart muscle pyruvate dehydrogenase kinase " Biochem. J. 143, 625-630.

Crompton, M., Sigel, E., Salzmann, M. y Carafoli, E. (1976) " A kinetic study of the energy-linked influx of  $Ca^{2+}$  into heart mitochondria" Eur. J. Biochem. 69, 429-434.

Davidoff, F. (1974) " Effects of the guanidine derivates on mitochondrial function :  $Ca^{2+}$  uptake and release" J. Biol. Chem. 249, 6404-6415.

de Bernard B, Pugliarello MC, Sandri G, Sottocasa GL, Vittur F. (1971) "Glycoprotein components, sialic acid and hexosamines, bound to inner and outer mitochondrial membranes". FEBS Lett. 12(3),125-128.

Denton, R. M y McCormack, J. G. (1980) "On the role of calcium transport system in Heart and other mammalian mitochondria" FEBS Lett. 119, 1-18.

Denton, R. M y McCormack, J. G. (1985) " Calcium transport in mammalian mitochondria and its role in hormone action" Am. J. Physiol. 249, E543- E554.

Diwan, J.J. (1987) " Mitochondrial transport of  $K^+$  and  $Mg^{+2}$ " Biochem. Biophys. Acta. 895, 155-165.

Dolgachova, L .P. y Scarpa, Y. Y.(1984) "Proceeding of symposium on the metabolic regulation of the physiological state" Russian Academic of Science, Pushchino pp. 55.

Doussiere, J., Ligeti, E. , Brandolin, B. y Vignais, P. V. (1984) "Control of oxidative phosphorylation in rat heart mitochondria. The role of the adenine nucleotide carrier". Biochem. Biophys. Acta. 766, 492-500.

Drahota, Z., Gazzotti, P., Carafoli, E. y Rossi, C. S. (1969) "A comparison of the effects of different divalent cations on a number of mitochondrial reactions linked to ion translocation." Arch. Biochem. Biophys. 130, 267-273.

Ezawa, I. y Ortega, E. (1979) " $Ca^{2+}$  -induced activation of succinate dehydrogenase and the regulation of mitochondrial oxidative reactions" J. Biochem. 85, 65.

Farber, J. L. (1982) " Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of necrosis" Lab. Invest. 47, 114-123.

Farber, J. L. (1990) "The role of calcium in lethal cell injury". Chem Res. Toxicol. 3, 503-508.

Fletcher, J. M., Greenfield B.F., Hardy C. J., Scargill D. Woodhead J. L.  
(1961) 2000-2006.

Foldes, M. y Barrit, G. J. (1977) " Regulation by  $Ca^{2+}$  ions of pyruvate carboxylation , pyruvate transport and adenine nucleotide transport in RLM" J. Biol. Chem. 252, 5372.

Gasnier, F., Rousson, R., Lerme, F., Vaganay, E., Louisot, P. y Gateau-Roesch, O. (1992) "Mitochondrial dolichyl-phosphate mannose synthase". Eur. J. Biochem. 206, 853-858.

Gemba, M. ( 1974) "Effect of diuretics on ion transport of kidney cortex mitochondria" Jpn. J. Pharmacol. 24, 271-277.

Glew, R., y Breuel, Z. (1938) Inorg. Chem. 237-350

Glew, R., Kayman, S. & Kuhlenschmidt, M. (1973) "Studies on the binding of concanavalin A to rat liver mitochondria". J. Biol Chem. 248(9), 3137-45.

Gómez-Poyou, A. Tuena de Gómez-Puyou, M., Bexker, G. y Lenhinger, A. (1972) " A insoluble  $Ca^{2+}$  binding factor from rat liver mitochondria". Biochem. Biophys. Res. Commun 41, 814-819.

Gunter, T. E. y Pfeiffer, D. R. (1990) " Mechanisms by which mitochondria transport calcium" Am J. Physiol. 258, C755-C786.

Gustafson, G. T. y Pihl, E. (1969) Acta Path. Micob. Scand. 68, 3893.

Hansford, R. G. (1985) " Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism" Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 120, 1-7.

Heatons, G. M. y Nicholls, D. G. (1976) " The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of calcium electrochemical gradient" Biochem J. 156, 635-646.

Hoek, J. B. (1992) " Hormonal regulation of cellular energy metabolism" en Molecular mechanism in Bioenergetics. L. Ernester, Ed. Elsevier, Cap. IV.

Hutson, S. M. (1977) " Steady state of the energy-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  Uptake in rat liver mitochondria" J. Biol. Chem. 252, 4539-4545.

Hutson, S. M., Pfeifer, D. R. y Lady, H. A. (1976) "Efect of cations and anions on the steady state kinetics of energy-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in rat liver mitochondria" J. Biol. Chem 251, 5251-5258.

Jeng, A. Y. y Shamoo, A. E. (1980) "Isolation of  $\text{Ca}^{2+}$  carrier from calt heart inner mitochondria membrane". J Biol. Chem. 255, 6897-6903.

Joly, A. (1892)"Composés Ammoniacaux Dérivés du Sesquichlorure de Ruthénum". C. R. Acad. Sci. 115, 1299-1301

Kapoor, S. C. van Rossum, G. D. V., O'Neil, K. J. y Mercorella, I. (1985) " Uptake of inorganic lead in vitro by isolated mitochondria and tissue slices of rat renal cortex" Biochem. Pharmacol. 34, 1439-1448.

- Kobata, A. (1992) "Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins". Eur. J Biochem. 209,483-501. Review.
- Kotlyar, A. B. , Sled, U. D. y Vinogradou, A. D. (1992) "Effect of  $Ca^{2+}$  ions on the slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase" Biochem. Biophys. Acta 1098, 144-150.
- Kröner, H. (1986) "  $Ca^{2+}$  ions, an allosteric activator of  $Ca^{2+}$  uptake in rat liver mitochondria" Arch. Biochem. Biophys. 251, 525-535.
- Kun, E. (1976) " Kinetics of ATP-dependent Mg flux in mitochondria" Biochemistry. 15, 2328-2336.
- Lehninger, A. L., Carafoli, E. y Rossi ,C. S. ( 1967) " Energy-linked ion movements in mitochondria systems" Adv. Enzymol. 29, 259 - 320.
- Lehninger, A. (1971) " A insoluble heart labile high affinity  $Ca^{2+}$  binding factor extracted from rat liver mitochondria". Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 312-318.
- Lenzen, S., Münster, W. y Rustenbeck, I. (1992) "Dual effect of spermine on mitochondrial  $Ca^{2+}$  transport" . Biochem. J. 286, 597-602.

Levrat, C. y Ardail, D.(1990) "Biosynthesis of glycoconjugates in mitochondrial outer membranes. Preliminary characterization of the oligosaccharide moiety of a N-glycoprotein". Biochem. Int. 20,100-111.

Levrat, C. y Lousiat, P.(1989) "Topological investigations. Study of the trypsin sensitivity of the N-acetylglucosaminyl and mannosyl-transferase activities located in the outer mitochondrial membrane". J.Biochem.106, 133-138.

Litsky, M. y Pfeiffer, D. (1997) " Regulation of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-uniporter by external adenine nucleotides: the uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations". Biochemistry. 36(23),7071-80.

Lowry, O. Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. J. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 194, 265-275

Luft, J. H. (1965) J. Cell. Biol. 27, 614-620.

Luft, J. H. (1971) " Ruthenium red and Violet. Chemistry, purification methods of use for electron microscopy and mechanism of action" Anat. Rec. 171, 347-368.

- Marban, E. y Rink, T. J. (1980) " Free calcium in heart muscle at rest and during contraction measured with  $Ca^{2+}$  -sensitive microelectrodes" Nature 286, 845-850
- Martínez-Cruz, R., Corboda, F., Mires-López, J. C., Centeno, E., Pérez-Ortega, E., Martínez, M. y Pérez-Campos, E. (1999) "Effects of concanavalin A on protein-C activity". Life Science. 64, 879-885.
- Matlib, M., Zhou, Z., Knight, S., Altschuld, R., Ahmed, S., Choi, K., Krause-Bauer, J., Philips, R., Katsube, Y., Sperelakis, N., y Bers, D. (1990) "Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits  $Ca^{2+}$  uptake into mitochondria in vitro and *in situ* in single cardiac myocytes". J Biol. Chem. 273(17),10223-31.
- McCormack J. G., Helestrap A.P., Denton R. M. (1980) "Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism". Physiol. Rev. 70, 391-425.
- McMillin-Wood, J., Wolkowicz, P.E., Chu, A., Tate, C. A., Goldstone, M.A. y Entman, M. L. (1980) " Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart" Biochem. Biophys. Acta. 591, 251-265.
- Meijer, A. J., Van Woerkom, G. M., Steinman, R. y Williamson, J. R. (1981) " Inhibition by Ca of Carbamylphosphato synthetase" J. Biol. Chem. 256, 3443-pp.

- Mironova, G. D., Baumann, M., Kolomytkin, O., Krasichkova, Z., Berdimuratuu, A., Sirota, A., Virtaren, I. y Saris, N. E. (1994) "Purification of the channel component of the mitochondrial calcium uniporter and its reconstitution into planar lipid bilayers" J. Bioenerg. Biomembr. 26, 231-238.
- Mironova, G. D., Sirota, T. V., Pronevich, L.A., Trofimerki, N. V., Grigorejev, P. A. y Kondrashova, M. N. (1982) "Isolation and properties of  $Ca^{2+}$  transporting glycoproteins and peptide from beef heart mitochondria" J. Bioenerg. Biomembr. 14, 213-225.
- Moore, C. L. (1971) "Specific inhibition of mitochondrial  $Ca^{2+}$  transport by ruthenium red" Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 298-305.
- Moreno-Sánchez, R. y Hansford, R. G (1988) Relation between cytosolic free calcium and respiratory rates in cardiac myocytes. Am J Physiol. 255,H347-57.
- Moreno-Sánchez, R. y Hansford, R. G (1988) " Dependence of cardiac mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity on intramitochondrial free  $Ca^{2+}$  concentration". Biochem J. 256,403-12.
- Murphy, A. N. , Kelleher, J. K. y Fiskum, G. (1990) "Submicromolar  $Ca^{2+}$  regulates phosphorylating respiration by normal rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria by different mechanisms" J. Biol. Chem. 265, 10527-10534.
- Nicholls, D. G y Crompton, M. (1980) " Mitochondrial calcium transport" FEBS Lett. 111, 261 -268.

- Nicholls, D. G y Scott, I. D.( 1980) "The regulation of brain mitochondrial calcium-ion transport. The role of ATP in the discrimination between kinetic and membrane-potential-dependent calcium-ion efflux mechanisms". *Biochem. J.* 186(3),833-9.
- Nicotera, P., Bellomo, G. y Orrenius, S. (1990) "The role of  $\text{Ca}^{2+}$  in cell killing" *Chem. Res. Toxicol.* 3, 484-494.
- Noack, E. y Greeff, K. (1971) " Inhibition of calcium transport in mitochondria by  $\beta$ -receptor blocking substances and its reactivation by phospholipids" *Experientia Basel.* 27, 810-811.
- Panfili, E., Sandri, G., Sottocasa, G. L., Lunazzi, G., Liui, G. y Graziossi, G. (1976) "Specific inhibition of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport by antibodies directed to the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding glycoprotein". *Nature.* 264,185-6.
- Pfeiffer, D. R. , Hutson, S. M., Kauffman, R.F. y Lardy, H. A. (1976) "Some effects of ionophore A 23'87 on energy utilization and the distribution of cation and anions in mitochondria" *Biochemistry* 15, 2690-2697.
- Prestipino, G., Ceccarelli, D., Conti, F. y Carafoli , E. (1974) "Interaction of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  binding glycoprotein with lipid bilayer membranes" *FEBS Lett.* 45, 99-103.
- Puskin, J. S. y Gunter, T. E. (1976) " Ion and pH gradients across the transport membrane of mitochondrial following  $\text{Mn}^{2+}$  uptake in the presence of acetate" *Biochemistry.* 15, 3834- 3842.

- Puskin, J. S., Gunter, T. E., Gunter, K. K., Russell, P.R. (1976) "Evidence for more than one  $\text{Ca}^{2+}$  transport mechanism in mitochondria" *Biochemistry*. 15, 3834-3842.
- Radi, R., Turrenst, J. F., Chang, L. Y. y Bush, K. M. (1991) "Detection of catalase in rat heart mitochondria". *J. Biol. Chem.* 266, 22028-22034.
- Reed, K. C. y Bygrave, F. L (1972) "The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red" *Biochem J.* 138, 239-252.
- Reed, K. C. y Bygrave, F.L (1974) "A kinetic study of mitochondrial calcium transport" *FEBS Letter* 46, 109-114
- Reed, D.J. (1990) "Review of the current status of calcium and thiols in cellular injury" *Chem. Res. Toxicol.* 3, 495-502.
- Reed, K.C. y Bygrave, F. L. (1975) "The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red". *Eur. J. Chem.* 55, 497-504.
- Reynafarje, B. y Lehninger, A. (1969) "High affinity and low affinity binding of  $\text{Ca}^{2+}$  by rat liver mitochondria" *J. Biol Chem.* 244, 584-593.
- Riley, W. W. Jr. y Pfeifer, D. R. (1986) "Rapid and extensive release of  $\text{Ca}^{2+}$  From energy mitochondria induced by EGTA" *J. Biol. Chem.* 261, 28-31.

- Rossi, C. S., Vasington, F. D. y Carafoli, E. (1973) The effect of ruthenium red on the uptake  $\text{Ca}^{+2}$  and release of  $\text{Ca}^{+2}$  by mitochondria Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 846-852.
- Rottenberg, H. y Scarpa, A. (1974) " Calcium uptake and membrane potential in mitochondrial" Biochemistry. 13, 4811-4866.
- Rudge, J. S. y Morphy, S. (1984) "Concanavalin A binding glycoproteins in subcellular fraction from developing rat cerebral cortex" J. Neurochem. 43, 891-894.
- Rugolo, M. y Zoccarato, F. (1984) "  $\text{Mg}^{+2}$  transport by brain mitochondria: energy requirement and dependence on calcium efflux" J. Neurochem. 42, 1127-1130.
- Sandri, G., Panfili, E. y Sottocasa, G. L. (1976) "The calcium-binding glycoprotein and mitochondrial calcium movements" Biochem. Biophys. Res. Com. 68, 1272-1279.
- Saris, N., Sirota, T. V., Virtanen, I., Niva, K., Penttila, T., Dolgachova, L. P. y Mironova, G. (1993) "Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by antibodies against a 40 kDa glycoproteins" J. Bioenerg. Biomembr. 25, 307-312.
- Scarpa, A. y Azzone, G. F. (1970) " The mechanism of ion translocation in mitochondria. Coupling of  $\text{K}^{+}$  efflux with  $\text{Ca}$  uptake" Eur. J. Biochem 12, 328-335.

Scarpa, A. y Graziottl, P. (1973) " Mechanism for intracellular  $Ca^{+2}$  regulation in heart" J. Gen Physiol. 62, 756-772.

Schachler, H.(1970) J. Biochem. 245,1090-1100.

Schnaintman, C. y Gene, E. V.(1967) " The submitochondrial localization of monoamine oxidase". J Cell Biol.32, 719-735.

Schnaintman, C. y Greenawlt, J. W.(1968) " Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria". J Cell Biol.38, 158-175.

Slate, E.C. y Cleland, K. W. (1953) " The effect of  $Ca^{2+}$  on the respiratory and phosphorilative activities of heart muscle sarcisimes" Biochem. J. 55, 566-570.

Sottocasa, G. L., Sandri, G., Panfilli, E., De Bernard, B. A. (1971) "Glycoprotein located in the intermembrane space of rat liver mitochondria". FEBS Lett. 17, 100-105

Sparanga, G., Gunter, K., Shen, S., y Gunter, T. (1995) "Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. J. Biol. Chem. 270,27510-5.

Staler, E. C. y Cleland, K. W. (1953) " The effect of  $Ca^{+2}$  on the respiratory and phosphorilative activities of heart-muscle sarcosomes" Biochem J. 55, 566-571.

Utesheva, Zh. A., Sirota, T. V. y Mironova, G. D. (1970) "Molecular mechanism of calcium ion transport in mitochondria. II. Parameters of  $Ca^{2+}$  binding with glycoprotein and glycoprotein-peptide complex" Ukr Biokhim Zh. Russian. 61,54-8.

Tashmukhamedov, B.A., Gagelgans, A. I., Mamatkulov, K. y Makhmudova, E. M. (1972) "inhibition of  $Ca^{2+}$  transport in mitochondria by selective blockade of membrane mucopolysaccharides by hexamine cobaltichloride". FEBS Lett. 28, 239-242.

Vainio, H., Mela, L. y Chance, B. (1970) " Energy-dependent bivalent cation translocation in rat liver mitochondria" Eur. J. Biochem. 12, 387-391.

Vasington, F. D y Murphy, J. V. (1962) " $Ca^{+2}$  uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation" J. Biol. Chem. 237, 2670 – 2677.

Vercesi, A., Reynafarge, B. y Lehninger, A. L. (1978) " Stoichiometry of  $H^+$  ejection and  $Ca^{+2}$  uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria" J. Biol. Chem. 253, 6379-6385.

Vinogradov, A. y Scarpa, A. ( 1973) " The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria" J. Bioenerg. Biomembr. 49, 607-607.

Voelker, D. y Smejtek, P. (1996) "Adsorption of ruthenium red to phospholipid membranes". Biophys J. 70(2),818-30.

Voet, D.(1996).Bioquímica. Ed. John Wiley & Sons. U.S.A.pp1359.

Weihua, Li., Shariat-Madar, A., Powers, M., Gun, X., Lane, R. D. y Garlid, K. D. (1992) " Reconstitution, identification, purification, and immunological characterization of the 110 kDa  $Na^+$  /  $Ca^{2+}$  antiporter from beef heart mitochondrial" J . Biol. Chem. 267, 17983-17989.

Wernette, M. E., Ochs, R. S. y Lardy, H. A. (1981) "  $Ca^{+2}$  stimulation of RLM glycerophosphate dehydrogenase" J.Biol. Chem. 256, 12767.

Ying, W. L. y Sanadi, R. (1991) "Partial purification of the mitochondrial  $Ca^{2+}$  uniporter. Comunicación personal.

Ying, W., Emerson, J., Clarke, M. y Sanadi, R. (1990) " Inhibition of mitochondrial calcium ion transport by an oxo-bridged dinuclear ruthenium ammine complex" Biochemistry. 30,4949-52.

Zazueta, C. Reyes-Vivas, H., Corona, N., Bravo, C. Chávez, E. (1994).  
"On the role of ADP to increase the inhibitory effect of cyclosporin on  
mitochondrial membrane permeability transition". *Biochem. Mol. Biol.  
Int.* 33, 385-392.

Zazueta, C., Masso, F., Paez, A., Bravo, C., Vega, A., Montañó, L.,  
Vázquez, M., Ramírez, J. y Chávez, E. (1994) "Identification of 20  
kDa protein with calcium uptake transport activity reconstitution in a  
membrane model". *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 555-561.

Zazueta, C., Zafra, G., Vera, G., Sánchez, C. y Chávez, E. (1998)  
"Advances in the purification of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter  
using the labeled inhibitor 103 Ru 360 *J. Bioenerg Biomembr.*  
30:489-98.

Zazueta, C., Sosa-Torres, M., Correa, F. y Garza-Ortiz, A. (1999)  
"Inhibitory properties of ruthenium amine complex on mitochondrial  
calcium uptake", *J. Bioenerg. Biomembr.* 31 , 551-557.