

24/03/2010

NO APT

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO SOBRE EL TRANSPORTE DE ADENIN NUCLEOTIDOS
Y CATIONES A TRAVES DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL

T E S I S

149

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

PRESENTA

MARIA CONCEPCION DEL CARMEN OCAMPO RUIZ

MEXICO, D.F.

1 9 8 4



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INTEGRANTES DEL HONORABLE JURADO

PRESIDENTE	DR. ARMANDO GOMEZ PUYOU
1er. VOCAL	DR. EDMUNDO CHAVEZ COSSIO
SECRETARIO	DRA. MARIETA TUENA DE GOMEZ PUYOU
SUPLENTE	DR. ALFONSO CARABEZ TREJO
SUPLENTE	DRA. MARINA GAVILANES RUIZ

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ" BAJO LA DIRECCION DEL DR. EDMUNDO CHAVEZ COSSIO.

NOMBRE DEL SUSTENTANTE

MARIA CONCEPCION DEL CARMEN OCAMPO RUIZ

Maria Concepcion del Carmen Ocampo Ruiz

NOMBRE DEL ASESOR DEL TEMA

DR. EDMUNDO CHAVEZ COSSIO

E. Chavez

DESEO HACER PATENTE MI AGRADECIMIENTO

Al DR. EDMUNDO CHAVEZ COSSIO por
su valiosa dirección y apoyo
brindados durante la realización
del presente trabajo.

Al DR. ARMANDO GOMEZ PUYOU y a
la DRA. MARIETA TUENA DE GOMEZ
PUYOU por sus interesantes
comentarios a este trabajo.

EL PRESENTE TRABAJO
LO DEDICO CON GRAN CARIÑO

A MIS QUERIDOS PADRES

Y A MIS HERMANOS

FUR MEINEN BESTEN FREUNDEN

AUS MEXIKO UND AUS DEUTSCHLAND

"WO DEIN SCHATZ IST,
DORT DEIN HERZ IST"

S.J. 6,21

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	1
I.- INTRODUCCION	3
1.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS ACARREADORES MITOCONDRIALES	4
a) NATURALEZA Y DISTRIBUCION DE LOS ACARREADORES	4
b) VECTORIALIDAD EN LOS MECANISMOS DE TRANSPORTE	6
2.- ACARREADOR DE ADENIN NUCLEOTIDOS (ADP/ATP TRANSLOCASA)	7
a) AISLAMIENTO Y NATURALEZA HIDROFOBICA DE LA ADP/ATP TRANSLOCASA	7
b) ESTRUCTURA DIMERICA DE LA ADP/ATP TRANSLOCASA	8
c) ESTADOS CONFORMACIONALES DE LA ADP/ATP TRANSLOCASA	9
d) MODELO GEOMETRICO DE LA ADP/ATP TRANSLOCASA	9
e) MODELOS CINETICOS EN EL SISTEMA RECONSTITUIDO DE LA ADP/ATP TRANSLOCASA	10
f) PAPEL REGULADOR DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EN EL INTERCAMBIO ADP/ATP	12
3.- ANTECEDENTES SOBRE EL MECANISMO DE TRANSLOCACION DE ADP/ATP	13
4.- HIPOTESIS DE ESTUDIO	15
II.-MATERIALES Y METODOS	17
1.- TRANSPORTE DE ADENIN NUCLEOTIDOS ,CALCIO Y POTASIO	17
a) MEDICION DIRECTA DEL TRANSPORTE POR LA TECNICA DEL HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL	17
b) DETERMINACION DE ATP MITOCONDRIAL	18
c) DETERMINACION DE LA SALIDA DE POTASIO INTRAMITOCON- DRIAL UTILIZANDO ⁸⁶ Rb	19
d) DETERMINACION DE CATIONES DIVALENTES	20
e) DETERMINACION FLAMOMETRICA DEL CALCIO LIBERADO	21
f) DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DEL MAGNESIO LIBERADO	21

g)	DETERMINACION DEL POTENCIAL DE MEMBRANA	22
III.-	RESULTADOS	24
a)	HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL POR ENTRADA DE Pi	24
b)	HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL DEPENDIENTE DE ENERGIA	26
c)	CONTRACCION MITOCONDRIAL Y FOSFORILACION OXIDATIVA	26
d)	CONTRACCION MITOCONDRIAL SENSIBLE A ATRACTILOSIDO	
	EFECTO DEL FCCP	28
e)	SINTESIS DE ATP	28
f)	MOVIMIENTO DE K ⁺	32
g)	MOVIMIENTO DE Ca ²⁺	34
h)	MOVIMIENTO DE Mg ²⁺	40
i)	EFECTO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EN EL FENOMENO	
	OSMOTICO MITOCONDRIAL	40
IV.-	DISCUSION	46
V.-	BIBLIOGRAFIA	50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.-	EFEECTO DEL MERSALIL EN EL HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL	25
Figura 2.-	DEPENDENCIA DE ENERGIA EN EL HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL	27
Figura 3.-	EFEECTO DE LA OLIGOMICINA SOBRE LA CONTRACCION MITOCONDRIAL INDUCIDA POR ADP	29
Figura 4.-	ACCION DEL ATRACTILOSIDO Y DEL FCCP EN LA CONTRACCION Y EN EL HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL	30
Figura 5.-	EFEECTO DEL EDTA O EGTA Y DEL X-537A EN LOS CAMBIOS OSMOTICOS MITOCONDRIALES	36
Figura 6.-	ACCION DEL ROJO DE RUTENIO (RR) Y LANTANO (La ³⁺) SOBRE LA CONTRACCION MITOCONDRIAL INDUCIDA POR ADP	39
Figura 7.-	INFLUENCIA DE AGENTES QUELANTES SOBRE EL MOVIMIENTO DE CATIONES DIVALENTES	42
Esquema 1.	EFEECTO DEL FCCP SOBRE EL HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL	31

INDICE DE TABLAS

Tabla I.-	RELACION DE V_{max} CON LA DISTRIBUCION DE $ADP_e \rightleftharpoons ATP_i$ Y $ATP_e \rightleftharpoons ADP_i$ PARA LOS MODELOS CINETICOS (DE AFINIDAD Y VELOCIDAD) Y $\Delta\psi = 180$ mV	11
Tabla II.-	EFECTO DEL MERSALIL Y EL ATRACTILOSIDO SOBRE LA FOSFORILACION OXIDATIVA PARCIALMENTE DEPENDIENTE DE LA CONTRACCION MITOCONDRIAL	33
Tabla III.-	INFLUENCIA DEL MERSALIL Y EL ADP SOBRE LA LIBERACION INTRAMITOCONDRIAL DE ^{86}Rb	35
Tabla IV.-	DETERMINACION FLAMOMETRICA DE LA LIBERACION DE Ca^{2+}	38
Tabla V.-	EFECTO DEL EGTA Y DEL ROJO DE RUTENIO EN LA SINTESIS DE ATP	41
Tabla VI.-	CONCENTRACION INTRAMITOCONDRIAL DE Mg^{2+}	43
Tabla VII.-	EFECTO DEL MERSALIL Y EL ADP SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	45

ABREVIATURAS

A_{280}	Absorbancia a 280 nm
$ADP_{e,i}^{3-}$	Adenosín 5'-difosfato externo,interno
$ATP_{e,i}^{4-}$	Adenosín 5'-trifosfato externo,interno
AN	Adenín nucleótidos
ATR,atr	Atractilósido
BK	Acido bongkrékico
C^+	Catión
Ca^{2+}	Calcio
CATR	Carboxiatractilósido
CTC	Clorotetraciclina
DSS	Dodecil sulfato de sodio
EDTA	Acido etiléndiaminotetraacético
EGTA	Acido etilénglicol-bis-(3-amino-etiléter)N,N' tetraacético
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
$H_2PO_4^-$	Fosfato diácido de sodio
HPO_4^{2-}	Fosfato monoácido de sodio
K^+	Potasio
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
La^{3+}	Lantano
nm	nanometro
Mers,mers	Mersalil
Mg^{2+}	Magnesio
MHR	Mitocondrias de hígado de rata

NEM	N-etilmaleimida
Pi	Fosfato
Pi ⁻ / OH ⁻	Acarreador de fosfato (intercambio de fosfato con una carga negativa por un ión oxhidrilo)
P:O	Fosforilación oxidativa
$\Delta\Psi$	Potencial de membrana
$\Delta\mu$	Potencial electroquímico
⁸⁶ Rb	Radioisótopo rubidio-86
RR	Rojo de rutenio
u.D.O.	Unidades de densidad óptica
u.F.	Unidades de Fluorescencia

RESUMEN

La adenín nucleótido translocasa mitocondrial es el sistema de transporte activo más importante en mitocondrias (10). Este sistema se encarga de llevar a cabo el intercambio o translocación de ADP y ATP a través de la membrana interna mitocondrial (10).

La translocasa de ADP-ATP es el polipéptido más abundante que reside en la membrana mitocondrial interna (10); se caracteriza por su alta especificidad para ADP y ATP, así como por su sensibilidad a los inhibidores atractilósido y ácido bongkrékico que bloquean el intercambio de los adenín nucleótidos del lado citosólico o de la matriz mitocondrial, respectivamente (16).

Se sabe que el intercambio de ADP, ATP, exógeno y endógeno tiene lugar a través de la membrana mitocondrial en relación 1:1. Este intercambio es dependiente del potencial de membrana y da lugar, en mitocondrias acopladas a una captación preferente de ADP que de ATP y en mitocondrias desacopladas esta preferencia se elimina (16).

El propósito de este trabajo fue determinar las condiciones que gobiernan la salida selectiva del ATP intramitocondrial a través de la ADP/ATP translocasa y la participación del Ca^{2+} que se mueve en cotransporte con el nucleótido negativo.

Nuestro estudio se realizó en mitocondrias íntegras que al incubarse en un medio hipotónico se hincharon. El hinchamiento mitocondrial se midió en un espectrofotómetro a 546 nm, al registrar la disminución en la densidad óptica (26). Esta técnica se utilizó para seguir el movimiento de los adenín nucleótidos y cationes participantes en nuestras preparaciones.

a.- El fenómeno osmótico de hinchamiento mitocondrial observado fue dependiente de la entrada de Pi (32) e inhibido por la adición de mersalil en un medio de incubación que contenía succinato como sustrato.

b.- La contracción mitocondrial inducida por ADP se estudió en mitocondrias hinchadas en las condiciones anteriores a las que se les adicionó mersalil en la fase final del hinchamiento y con la adición subsecuente de ADP se registró el aumento en densidad óptica, mismo que fue sensible a FCCP.

El ATP sintetizado en las mitocondrias tratadas con mersalil y ADP fue determinado como se describe en (27).

Tomando en cuenta la controversia que existe acerca de la electrogenicidad parcial o total en el transporte de los adenín nucleótidos (23,42) a través de la membrana mitocondrial, decidimos estudiar la participación de los cationes K^+ y Ca^{2+} , durante el eflujo del ATP sintetizado en nuestras condiciones experimentales.

Para discriminar cual de los cationes participantes estaba más involucrado en este mecanismo de translocación de ADP y ATP elegimos ionóforos, inhibidores y agentes quelantes para estudiarlos. Encontramos que la valinomicina no modificó los cambios osmóticos mitocondriales ni la síntesis de ATP; en cambio la presencia de rojo de rutenio, Lantano, EGTA o EDTA y X537A inhibieron la contracción mitocondrial pero no la síntesis de ATP.

Considerando la sensibilidad del sistema translocador de ADP/ATP al potencial de membrana, efectuamos estas mediciones utilizando bromuro de etidio y encontramos un potencial electronegativo muy alto cuando la contracción mitocondrial tiene lugar.

I.- INTRODUCCION

Las mitocondrias de plantas y animales, son los organelos por excelencia encargados de transformar la energía de la respiración en otras formas de energía requeridas por la célula (/). Para que las mitocondrias desempeñen las funciones que les son propias, requieren de metabolitos, los cuales son transportados a través de la membrana mitocondrial por sistemas acarreadores específicos (2,3).

Estructuralmente, las mitocondrias constan de dos sistemas membranales que difieren en sus propiedades bioquímicas (4). Entre ambas membranas mitocondriales, interna y externa se localiza el espacio intermembranal y rodeada por la membrana interna la matriz mitocondrial.

La membrana externa (5) que tiene una relación lípido/proteína relativamente alta, no presenta invaginaciones y la relación superficie a volumen es baja. Esta membrana es permeable a la mayoría de las moléculas pequeñas con peso molecular de alrededor de 5 kilodaltones.

Por otra parte, la membrana interna (4) tiene una baja relación lípido/proteína, presenta muchas invaginaciones y la relación superficie a volumen es alta. La membrana interna a diferencia de la externa es altamente selectiva ya que en ella se localizan las proteínas de transporte o acarreadores específicos que catalizan el transporte de metabolitos específicos a través de la bicapa lipídica.

El trabajo pionero de Chappell y Cols. (2, 3) sobre procesos de transporte en mitocondrias demostró la existencia de gran número de sistemas acarreadores. Los principios básicos del trans-

porte mitocondrial están en armonía con los importantes conceptos de la hipótesis quiosmótica de la fosforilación oxidativa (6).

De acuerdo a esta hipótesis los protones son bombeados por enzimas de la cadena transportadora de electrones localizadas en la membrana mitocondrial interna, generando un gradiente eléctrico a través de la membrana interna cuyo interior es ahora negativo y el exterior positivo y un gradiente de pH, con el que la membrana mitocondrial interna adquiere un pH interno alcalino.

El potencial electroquímico (H^+) total, designado como $\Delta\mu_{H^+}$ se desarrolla a través de la membrana y toma valores que oscilan entre 180 y 220 mV (7,8).

La energía de este gradiente puede utilizarse para la síntesis de ATP por la ATPasa mitocondrial. El transporte de aniones contra este potencial eléctrico requeriría del gasto de cierta cantidad de energía pero también pueden transportarse aniones con protones en forma simultánea neutralizando la carga desfavorable y facilitando su acumulación en la matriz en proporción al Δ pH. Una vez dentro de la matriz, pueden intercambiarse por otros aniones externos y este movimiento iónico puede ser facilitado por el potencial de membrana.

1.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS ACARREADORES MITOCONDRIALES.

a) NATURALEZA Y DISTRIBUCION DE LOS ACARREADORES.

Los acarreadores específicos mitocondriales poseen mecanismos moleculares que utilizan el potencial electroquímico de H^+ transmembranal para facilitar el transporte tanto en una dirección como en la otra y de esta manera, los acarreadores determinan la dirección del proceso de transporte.

La síntesis de ATP es una función común a todas las mitocondrias y requiere de la entrada de oxígeno, ADP, Pi y sustratos ricos en hidrógenos tales como piruvato y ácidos grasos. Los productos de estas reacciones : son H₂O y CO₂ libremente permeables a la membrana mitocondrial. Sin embargo, en la mayoría de las mitocondrias se encuentran acarreadores especializados para transportar Pi, piruvato y ácidos grasos.

El acarreador de Pi es el sistema de transporte mitocondrial más rápido. Este sistema de transporte se inhibe con mersalil y N-etilmaleimida. Respecto a su mecanismo de transporte electro-neuro se han propuesto los intercambios $\text{Pi}^- / \text{OH}^-$, Pi^{2-} y H^+ / OH^- . La estequiometría de protones por fosfato reportado por Mc Givan y Klingenberg (9) fue medido a pH 7 y se encontró del orden de 1.5, esto es factible ya que a pH 7 el Pi existe en una mezcla de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- manteniendo una relación 1:1.

Existen otros dos acarreadores que parecen tener una amplia distribución: uno es el encargado de catalizar el intercambio malato/ α -Cetoglutarato y el otro el intercambio Glutamato/Aspartato. Estos están relacionados con una vía de transporte cíclico conocida como "LANZADERA" Malato-Aspartato, la cual se encarga de transportar los equivalentes reductores desde el citosol a la matriz mitocondrial. Las "LANZADERAS" son las rutas indirectas para transportar los equivalentes reductores formados en el citosol por la glicólisis al interior de la mitocondria. Los electrones del malato son transportados hacia el interior de la mitocondria por el acarreador que intercambia α -cetoglutarato por malato. Los equivalentes reductores pasan al NAD en la matriz por acción de la malato-deshidrogenasa y el oxaloacetato producto de

esta reacción es transaminado a aspartato por la transaminasa glutámico-oxaloacética. El aspartato es transportado hacia el exterior de la mitocondria en intercambio por glutamato. El aspartato citosólico es convertido a oxaloacetato y luego a malato para completar el ciclo.

El Acarreador de Dicarboxílicos identificado originalmente en mitocondrias de hígado de rata cataliza el intercambio electroneutró y activo de los ácidos dicarboxílicos del ciclo del ácido cítrico como también el intercambio de éstos con el Pi. Este acarreador tiene actividad mínima en mitocondrias de corazón.

El Acarreador de Tricarboxílicos cataliza el intercambio de citrato, isocitrato, fosfoenol-piruvato y malato. El intercambio entre estos metabolitos a través de la membrana mitocondrial de hígado y riñón es rápido.

b) VECTORIALIDAD EN LOS MECANISMOS DE TRANSPORTE.

El concepto de metabolismo vectorial introducido por Mitchell (6) en el estudio de transporte de metabolitos a través de una membrana biológica lo llevó a considerar los siguientes mecanismos de transporte o translocación.

Translocación primaria, es el proceso de transporte en el que la translocación está directamente unido a una reacción bioquímica y puede ser de dos clases:

Translocación de grupo ocurre a nivel de sustrato y la translocación de soluto unido a enzima en el cual, el soluto no participa en el intercambio de enlaces covalentes sino es translocado como resultado de tal reacción.

Translocación secundaria Es el proceso de transporte que no está

directamente unido a una reacción química o metabólica pero puede estar acoplado a ella. De este tipo son:

- **Unitransporte:** proceso de transporte en el que se transloca un solo sustrato por medio de un acarreador específico, equilibrando el sustrato a través de la membrana de acuerdo con su potencial electroquímico.

Cuando son dos los sustratos que interactúan con el acarreador se presentan 2 tipos de transporte: cotransporte y anti-transporte.

Cotransporte Proceso de transporte en el que dos solutos se equilibran a través de la membrana; ocurre cuando la translocación de un soluto se acopla a la translocación del otro en la misma dirección.

Antitransporte Proceso de transporte en el cual el equilibrio de solutos a través de la membrana se realiza cuando la translocación de un soluto se acopla a la translocación de otro en dirección opuesta.

2.- ACARREADOR DE ADENIN NUCLEOTIDOS (ADP / ATP TRANSLOCASA)

El translocador de ADP/ATP mitocondrial, es el sistema de transporte activo más importante en mitocondrias ya que cataliza el intercambio 1:1 entre los adenín nucleótidos intra y extramitocondriales, de los cuales sólo ADP y ATP son transportados. Los inhibidores altamente específicos para la ADP/ATP translocasa son el atractilósido y el ácido bongkrékico así como sus derivados el carboxiatractilósido y el ácido isobongkrékico (10).

a) AISLAMIENTO Y NATURALEZA HIDROFOBICA DE LA ADP/ATP TRANSLOCASA

La ADP/ATP translocasa mitocondrial ha sido purificada por Klingenberg y Cols. (11,12) en forma nativa utilizando el carbo-

xiatractilósido para conservar el estado nativo de la proteína y formando el Complejo Proteína-Acarreadora-Carboxiatractilósido. Considerando la naturaleza altamente hidrofóbica de la proteína translocadora de ADP/ATP se requirió de tritón X-100, detergente no iónico, en el proceso de aislamiento y purificación de la ADP/ATP translocasa unida a carboxiatractilósido. La estructura micelar del complejo proteína-acarreadora-carboxiatractilósido aislado estudiado por Klingenberg (13) tiene la siguiente composición: 150 moléculas de tritón X-100, 18 moléculas de fosfolípidos y 2 moléculas de la proteína translocadora ADP/ATP de 30 kilodaltones.

b) ESTRUCTURA DIMERICIA DE LA ADP/ATP TRANSLOCASA

Los estudios realizados por Klingenberg (14) y Hackenberg (15) sobre la estructura de la ADP/ATP translocasa postulan la existencia de la ADP/ATP translocasa como un dímero en su estado nativo, constituido por dos subunidades peptídicas idénticas de peso molecular de 30 kilodaltones. La presencia de carboxiatractilósido es importante durante el proceso de aislamiento para mantener la estructura dimérica de la ADP/ATP translocasa conservándola así en su estado nativo.

Otras evidencias sobre el estado dimérico de la ADP/ATP translocasa realizadas por Hackenberg (15) se basaron en estudios hidrodinámicos efectuados con el complejo proteína-acarreadora-carboxiatractilósido los cuales fueron: sedimentación en gradientes de sacarosa, filtración en gel y ultracentrifugación analítica. Además, el complejo proteína-acarreadora-carboxiatractilósido fue tratado con agentes caotrópicos obteniendo los monómeros de 30 kilodaltones inactivos (15). A partir del tratamiento con agen-

tes entrecruzadores, las subunidades monoméricas se asociaron formando el dímero de 60 kilodaltones (15). En el tratamiento electroforético en condiciones desnaturalizantes (utilizando DSS) del complejo proteína-acarreadora-carboxiatractilósido se obtuvo una sola banda de 30 kilodaltones en geles de 10-15% poliacrilamida-DSS, correspondientes al monómero (14).

c) ESTADOS CONFORMACIONALES DE LA ADP/ATP TRANSLOCASA

La peculiar capacidad del translocador de ADP/ATP mitocondrial para interactuar asimétricamente con inhibidores altamente específicos como el atractilósido y el ácido bongkrékico o sus derivados el carboxiatractilósido y el ácido isobongkrékico se utilizó en el estudio de la cinética de transporte. A la luz de estas observaciones Klingenberg (16) ha propuesto dos estados conformacionales para la translocasa de ADP/ATP; la conformación citosólica "c" con la que interactúan tanto el atractilósido como su derivado carboxiatractilósido y la conformación de la matriz mitocondrial "m" con la que interactúan los ácidos bongkrékico e isobongkrékico, estas conformaciones se distinguen por su diferente afinidad a los inhibidores.

En las mitocondrias aisladas el carboxiatractilósido se une preferentemente a la conformación "c" con ayuda del ATP endógeno que colabora en la orientación del acarreador, mientras que la interacción del ácido bongkrékico o su derivado requiere de ATP exógeno uniéndose preferentemente a la conformación "m", estos últimos inhibidores penetran la membrana mitocondrial interna y su unión con la translocasa de ADP/ATP es más débil (16).

d) MODELO GEOMETRICO DE LA ADP/ATP TRANSLOCASA

Los estudios realizados por Klingenberg (17) sobre el a-

rreglo membranal de la ADP/ATP translocasa mitocondrial lo llevaron a postular un modelo geométrico del complejo proteína-acarreadora carboxiatractilósido, tomando en cuenta las mediciones de peso molecular, radio de Stokes, tamaño micelar + trión X-100. Mediante el modelo geométrico se visualiza al translocador de ADP/ATP como un elipsoide rotacional donde el centro hidrófobo del estado micelar se distorciona por la incorporación de la proteína apolar (estructura dimérica) a lo largo de los ejes de simetría de cada subunidad peptídica, los cuales caen perpendiculares al plano de la membrana.

Buchanan y Cols. (18) demostraron que la translocación de ADP/ATP ocurre por un proceso de transición entre los dos estados conformacionales "c" y m en el que participa la estructura dimérica funcional del acarreador de ADP/ATP.

e) MODELOS CINÉTICOS EN EL SISTEMA RECONSTITUIDO DE LA ADP/ATP TRANSLOCASA

Por otra parte con los estudios de Krämer y Klingenberg (19) en el sistema reconstituido en liposomas de la ADP/ATP translocasa se obtuvieron los siguientes valores (Tabla I) de K_m y V_{max} de captación de adenín nucleótidos en el sistema reconstituido. Con este sistema fue posible observar la influencia del potencial de membrana en la regulación de la ADP/ATP translocasa a partir de 2 modelos cinéticos: el de afinidad y el de velocidad. En el modelo de afinidad el potencial de membrana influye en la afinidad del acarreador de ADP/ATP hacia el ATP y el ADP. En cambio, en el modelo de velocidad el potencial de membrana modula los constantes de velocidad del intercambio ADP/ATP. Estos datos pueden apreciarse en la Tabla I.

TABLA I.- RELACION DE Vmax CON LA DISTRIBUCION DE $ADP \leftrightarrow ATP_i$
Y $ATP_e \leftrightarrow ADP_i$ PARA LOS MODELOS CINETICOS (DE AFI-
NIDAD Y VELOCIDAD) Y $\Delta\Psi = 180$ mV

Relación de V ($\Delta\Psi$; 180 mV)	Datos Teóricos Modelos		Datos Experimen- tales
	Afinidad	Velocidad	
$V_{ADP(0)} / V_{ATP(0)}$	0.9	1.0	0.9 ± 0.12
$V_{ADP(180)} / V_{ATP(180)}$	0.9	11.1	8.3 ± 2.3
$V_{ADP(180)} / V_{ADP(0)}$	1.0	2.75	2.55 ± 0.3
$V_{ATP(180)} / V_{ATP(0)}$	1.0	0.25	0.28 ± 0.08
Km_{ADP}	30	95	75 ± 21
Km_{ATP}	95	81	68 ± 18

De la Tabla I se puede concluir que las velocidades de intercambio de adenín nucleótidos calculadas por el Modelo de Velocidad para el sistema reconstituido son muy cercanas a los valores experimentales reportados y el efecto del potencial de membrana es evidente en la regulación.

f) PAPEL REGULADOR DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EN EL INTERCAMBIO ADP/ATP.

En el caso del sistema in situ, el proceso de translocación de ADP/ATP es regulado por el potencial de membrana a partir de esto Klingenberg (16) ha propuesto dos tipos de intercambio: simétrico y asimétrico.

El intercambio simétrico se estudió en mitocondrias deenergizadas por la adición de desacoplantes. En estas condiciones el ADP y el ATP son translocados hacia el interior y el exterior de la membrana mitocondrial con igual velocidad, en este caso la ADP/ATP translocasa funciona permitiendo el equilibrio entre los nucleótidos intra y extra mitocondriales. Por otra parte, el intercambio asimétrico se estudió en mitocondrias energizadas. Las velocidades de transporte de ADP por ATP en este caso fueron diferentes, siendo mayor el transporte de ADP hacia el interior que el ATP hacia el exterior, por lo que la relación ATP/ADP es mucho más alta en el exterior que en el interior de la mitocondria.

Durante el intercambio simétrico, las reacciones homogéneas $ATP_e \leftrightarrow ATP_i$, $ADP_e \leftrightarrow ADP_i$ y las heterogéneas $ATP_e \leftrightarrow ADP_i$ y $ADP_e \leftrightarrow ATP_i$ son electroneutras, ya que no son influenciadas por el potencial de membrana. Sin embargo, en el intercambio asimétrico las reacciones heterogéneas $ATP_e \leftrightarrow ADP_i$ y $ADP_e \leftrightarrow ATP_i$ no son electroneutras y

son influidas por el potencial de membrana, que establece una diferencia de carga transmembranal (negativa en el interior) que permite el intercambio de $ADP_e \leftrightarrow ATP_i$, siendo transportada hacia el interior la especie menos negativa, mientras la más negativa lo hace hacia el exterior (16).

3.- ANTECEDENTES SOBRE EL MECANISMO DE TRANSLOCACION DE ADP/ATP

Las reacciones de recambio ADP-ATP heterogéneas son intrínsecamente electrogénicas y en el estudio de Pfaff y Klingenberg (20) sobre el transporte de ADP, Pi y ATP, propusieron que el intercambio de ADP y ATP podía ser electroneutro si se acoplaba al transporte de otros iones de carga compensatoria. Las especies iónicas que propusieron fueron el Pi y H^+ . El Pi^- acoplado al transporte de ADP^{3-} hacia el interior de la mitocondria y lo análogo sucedería si un H^+ se acopla al transporte de ATP^{4-} , hacia el exterior todo esto en condiciones energizadas de la membrana.

Reforzando este modelo están los datos de Rossi y Azzone (21) quienes encuentran síntesis de ATP en presencia de un gradiente de K^+ inducido por valinomicina. Las mitocondrias después de acumular K^+ como fosfato de K^+ o acetato de K^+ lo liberaron al medio al adicionarles ADP y esta salida de K^+ indujo una entrada equivalente de H^+ debido a la presencia de mersalil y esta translocación de K^+/H^+ puso en evidencia la función de un acarreador de protones durante el transporte de ADP y ATP.

En cambio Mc Givan Grebe y Klingenberg (22) atribuyen un efecto parcial compensador de carga al Pi^- en el intercambio ADP^{3-}/ATP^{4-} . Los autores encontraron que en ausencia de N-etilmaleimida, un inhibidor del transporte de Pi^- , el intercambio

ADP/ATP fue considerable. Sin embargo, cuando la NEM estuvo presente el intercambio ADP/ATP fue inhibido no así el de ADP/ADP. Esto sugirió que la carga negativa del Pi^- transportado hacia el interior proporcionaba una compensación parcial durante el transporte $\text{ADP}^{3-}/\text{ATP}^{4-}$ y la inhibición por NEM impedía el intercambio ADP/ATP.

Wulf y colaboradores (23) propusieron que el transporte de ADP/ATP está influido por la energización de la membrana mitocondrial y esta energía proviene de la diferencia de carga entre ADP y ATP durante el intercambio. Bajo influencia de un potencial eléctrico a través de la membrana (interior negativo), la velocidad de entrada de una carga negativa del ATP contra el ADP es lenta y la salida de esa carga negativa en el intercambio ATP/ADP es acelerada. El potencial de membrana es la fuerza conductora para el intercambio ADP/ATP y es consistente con un potencial negativo. En el intercambio electroneutro se postularía la translocación de H^+ asociado al ATP (Como ATPH^{3-}) o unido al acarreador donde esta especie se transportaría de la siguiente manera:

$$\text{ATPH}^{3-}_e \rightarrow \text{ATPH}^{3-}_i \rightarrow \text{ATP}^{4-}_i + \text{H}^+_i$$

En el caso del intercambio electroquímico ATPe/ADPi es posible el reemplazamiento del H^+ por cationes (K^+) en presencia de valinomicina. Wulf y Cols. (23) encontraron liberación de H^+ en presencia de NEM como resultado de la inhibición de transporte de Pi cuando los H^+ son cotransportados con el Pi . El intercambio en la dirección opuesta ADPe/ATPi es inhibido por desacoplantes o ionóforos por lo que la salida de H^+ se asocia a la del ATP endógeno, con lo que la electroneutralidad del sistema

es cercana al 40% (parcialmente electroneutro). El transporte y la síntesis de ATP compiten por los H^+ generados durante el transporte de electrones.

Por otro lado Chávez (24) reportó que la translocación de ATP al interior de la mitocondria es impedida por la carga interna negativa de la mitocondria por lo que se acompaña del influjo de cationes; demostró además que en presencia de ATP, succinato de K^+ , dinitrifenol y mersalil ocurre un notable hinchamiento mitocondrial debido al P_i generado por la hidrólisis de ATP, que atrapado en el interior de la mitocondria por el mersalil originó un potencial negativo y la entrada de cationes.

4.- HIPOTESIS DE ESTUDIO

Considerando que la membrana mitocondrial posee una gran actividad de transporte mediada por acarreadores específicos que operan con cierto acoplamiento eléctrico, nuestra hipótesis de estudio fue demostrar si el mecanismo de intercambio de ADP por ATP mediado por la translocasa de adenín nucleótidos se comportaba completa o parcialmente electrogénico. Para esto se propone que la interacción de la ADP/ATP translocasa con el acarreador de P_i y el de calcio se acople funcionalmente y esto determine el tipo de mecanismo de translocación de ADP/ATP.

En este sentido es importante mencionar que el estudio del transporte de P_i como anión monovalente que se realiza por el acarreador específico de P_i en compañía de un H^+ , recambiándose por el OH interno, sugiere un mecanismo electroneutro entre P_i^- y el OH^- .

En el caso del intercambio de ADP^{3-} por ATP^{4-} existen las alternativas siguientes: una consiste en utilizar el H^+ en co-

transporte con el ATP^{4-} sintetizado en el interior y de esta manera mantener la electroneutralidad. Sin embargo, enfocando el estudio hacia la presencia de cationes en este intercambio, se encontró que el K^+ no tuvo influencia en el intercambio de adenín nucleótidos y que la presencia de cationes divalentes fue interesante, observándose que los movimientos de calcio durante la salida de ATP^{4-} sugerían algo más sobre el mecanismo de parcial electroneutralidad o electrogenicidad, siendo poco significativos los movimientos de Mg^{2+} en el sistema en estudio.

II.- MATERIALES Y METODOS

1.- TRANSPORTE DE ADENIN NUCLEOTIDOS, CALCIO Y POTASIO.

Para estudiar el transporte de adenín nucleótidos, Ca^{2+} y K^+ se utilizaron mitocondrias aisladas de hígado de rata siguiendo el procedimiento descrito por Schneider y Hogeboom (25) que requiere de un buffer que contenía sacarosa 250 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, a pH 7.2.

a) MEDICION DIRECTA DEL TRANSPORTE POR LA TECNICA DEL HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL.

El hinchamiento mitocondrial (26) es una técnica utilizada en el estudio cualitativo de transporte de metabolitos. El fenómeno del hinchamiento mitocondrial ocurre cuando grandes cantidades de soluto entran a la matriz mitocondrial, causando aumento en la presión osmótica y aumento en el volumen de la matriz mitocondrial. El grado de hinchamiento mitocondrial se mide espectrofotométricamente a 546nm como una disminución en la densidad óptica en una suspensión de mitocondrias. Con análisis más sofisticados se puede predecir si el movimiento electrogénico o electroneutro de ciertos iones ocurre vía un acarreador específico.

En nuestro estudio, el transporte de los nucleótidos, ADP, ATP y los cationes Ca^{2+} y K^+ se realizó utilizando 2 mg de mitocondrias íntegras incubadas en un medio hipotónico que contenía: succinato 10 mM, fosfato 10 mM, sacarosa 40 mM, EDTA 0.1 mM, Tris-HCl 10 mM, 10 μg de rotenona, a pH 7.3. El volumen final fue de 3 ml. El método consistió en seguir la disminución y aumento en la densidad óptica (hinchamiento y contracción mitocondrial, respectivamente) causado por los cambios osmóticos

que se generan por el movimiento de iones y agua a través de la membrana mitocondrial y registrados a 546 nm en un espectrofotómetro (Cecil Instruments).

Las adiciones efectuadas fueron: mersalil 10 μM (inhibidor del transporte de Pi), ADP 1.4 mM (induce la contracción mitocondrial unido a mersalil), ATR 40 μM (inhibidor de la ADP/ATP translocasa), FCCP 2 μM (agente desacoplante), EGTA o EDTA 500 μM (agentes quelantes), X-537A 1×10^{-4} mM (ionóforo de cationes divalentes), rojo de rutenio 10 μM y lantano 20 μM (inhibidores del transporte de calcio), 10 μg de oligomicina (inhibidor del canal de H^+) y 10 μg de antimicina A (inhibidor del transporte de electrones en el sitio 2 de la cadena respiratoria).

Estas adiciones se hicieron en los tiempos indicados, como se ilustra en las figuras 1-5 y 7 que aparecen en la sección de resultados.

b) DETERMINACION DE ATP MITOCONDRIAL

El contenido de ATP mitocondrial total se midió siguiendo la técnica descrita por Bergmeyer (27). En nuestro experimento la determinación se llevó a cabo en 2 ml del sobrenadante obtenido al precipitar 3 ml de la preparación utilizada en la medición de transporte por hinchamiento-contracción mitocondrial (detallada en la medición de transporte y en la Fig. 1) con 300 μl de ácido perclórico al 35% a 0°C. Después de centrifugar a 2500 rpm (Sorvall RC 5B, rotor SS34) durante 10 min se descartó el precipitado y el sobrenadante se neutralizó con 140 μl de KOH (50%)/tris (1M). Para efectuar la determinación de ATP se incubaron los 2 ml del sobrenadante en un medio que contenía 12 μmoles de glucosa, 75 U/ml de hexocinasa, Tris-HCl 10 mM pH 8, MgCl_2

8 mM, 75 U /ml de glucosa -6-fosfato deshidrogenasa y con 4.8 μ moles de NADP se inició la reacción. La reducción de NADP se midió espectrofotométricamente (Cecil Instruments) a 340 nm. Los valores obtenidos se extrapolaron de una curva control para NADH a diferentes concentraciones.

El volumen final en los ensayos fue de 3 ml.

c) DETERMINACION DE LA SALIDA DE POTASIO INTRAMITOCONDRIAL UTILIZANDO ⁸⁶Rb.

La salida de potasio mitocondrial se estudió en mitocondrias cargadas con ⁸⁶Rb de acuerdo al siguiente protocolo: 80 mg de proteína mitocondrial (en 2 ml) se incubaron en un medio que contenía succinato 10 mM, fosfato 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.3 10 μ g de rotenona y 1600 nmoles de Rb marcado con ⁸⁶Rb con una actividad específica de 2.2 μ Ci/ μ g. El volumen final fue de 6 ml después de una incubación de 20 min. a temperatura ambiente, las mitocondrias se lavaron dos veces en 30 ml de sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM a pH 7.3 para remover la radioactividad externa, sedimentándolas a 10 000 rpm (Sorvall RC 5B, rotor SS 34) durante 10 min.

La salida de rubidio se midió utilizando 2.5 mg de mitocondrias cargadas con ⁸⁶Rb en un medio que contenía glutamato 10 mM, malato 10 mM, fosfato 10 mM, sacarosa 40 mM, a pH 7.3 El volumen final fue de 3 ml. Las adiciones de mersalil 10 μ M y ADP 1.4 mM se efectuaron 2 y 3 minutos después de iniciada la incubación con 2.5 mg de MHR siguiendo el modelo de hinchamiento de la Fig. 1. El tiempo total de incubación fue de 5 min. La reacción se paró por filtración (filtros Millipore, 0.45 μ M) y la radioactividad en los filtros se midió en un Contador de Centelleo Mark II

d) DETERMINACION DE CATIONES DIVALENTES

El efecto de los agentes quelantes EDTA y EGTA 500 μM en el movimiento de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} se estudió durante el hinchamiento y contracción mitocondrial midiendo los cambios en densidad óptica a 546 nm en un espectrofotómetro. La incubación se llevó a cabo con 2 mg de proteína mitocondrial en 3 ml del medio descrito antes. Las adiciones de EGTA y EDTA 500 μM se efectuaron tanto al inicio del hinchamiento como entre el mersalil y el ADP. Estos trazos se ilustran en la Fig. 5 de la sección de resultados.

El mismo procedimiento se siguió al adicionar el ionóforo X-537A (28) específico para Ca^{2+} en una concentración final de 1×10^{-4} mM, justo en la fase final del hinchamiento. El trazo correspondiente se ilustra en la Fig. 5C en la sección de resultados.

El transporte de Ca^{2+} se estudió en el sistema de hinchamiento y contracción mitocondrial (ya descrito) registrando los cambios en D.O. a 546 nm y utilizando los inhibidores específicos del transporte de Ca^{2+} ; rojo de rutenio (RR) 10 μM y lantano (La^{3+}) 20 μM , los cuales se adicionaron al inicio de la incubación. El volumen final fue de 3 ml. Los trazos correspondientes se ilustran en la Fig 6 (A,B).

Otra técnica empleada para detectar el movimiento de cationes divalentes, fue seguir los cambios de fluorescencia de la clorotetraciclina (CTC) (29-31) a 380 nm (λ excitación) ventana 4 nm y 525 nm (λ emisión) ventana 5 nm en un espectrofluorómetro (Aminco SPF 500). Nuestro experimento consistió en incubar 2 mg de mitocondrias íntegras (MHR) en el medio hipotónico ya

descrito. Las adiciones de mersalil $10 \mu\text{M}$ se efectuaron 2 min después de iniciada la incubación, el ADP 1.4 mM se adicionó 3 y 4 min. después y el EGTA, o EDTA $500 \mu\text{M}$ se adicionaron tanto al inicio como entre la adición de mersalil y ADP. La clorotetraciclina $30 \mu\text{g}$ se adicionó al medio de incubación inicialmente. El volumen final fue de 3 ml. Los trazos correspondientes se ilustran en la Fig 7 (A,B,C) en la sección de resultados.

e) DETERMINACION FLAMOMETRICA DEL CALCIO LIBERADO.

La liberación del calcio mitocondrial se determinó por medición flamométrica. 2 mg de la suspensión mitocondrial se incubaron en el medio hipotónico ya descrito, con las adiciones previas de mersalil $10 \mu\text{M}$ (2 min), ADP 1.4 mM (3 y 4 min) X-537A $1 \times 10^{-4} \text{ mM}$. (0 y 3 min). Los tiempos de adición se indican entre paréntesis, el volumen final fue de 3 ml. El tiempo total de incubación fue de 3 min. La preparación se centrifugó a 10 000 (Sorvall RC 5B, rotor SS34) 10 min y en 2.5 ml del sobrenadante obtenido se llevó a cabo la determinación de calcio. La calibración del flamómetro (Zeiss, Pf 5 37177) se llevó a cabo con una solución estándar de CaCl_2 $10 \mu\text{M}$. Los datos obtenidos se ilustran en la Tabla IV de la sección de resultados.

f) DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DEL MAGNESIO LIBERADO.

La determinación del magnesio mitocondrial liberado, se llevó a cabo espectrofotométricamente a 505 nm. Nuestro ensayo consistió en incubar 2 mg de la suspensión mitocondrial en el medio hipotónico ya descrito y con las adiciones previas de ADP 1.4 mM (0 y 3 min) y mersalil $10 \mu\text{M}$ (0 y 3 min) y mersalil $10 \mu\text{M}$ (0 y 3 min) y mersalil $10 \mu\text{M}$ (0 y 2 min). Los tiempos de adición se indican entre paréntesis. El volumen final fue de 3 ml

El tiempo total de incubación fue 5 min. La preparación se centrifugó a 10 000 rpm (Sorvall RC5B rotor SS34) durante 10 min y en 1 ml del sobrenadante obtenido se llevó a cabo la determinación de Mg^{2+} .

La técnica de determinación de magnesio (Merkotest, Magnesio, Merck) se basa en la formación de un complejo soluble de color rojo, que pone de manifiesto la presencia de magnesio al reaccionar con el colorante 1-azo-2-hidroxi-3 (2,4-dimetilcarbocianilido) naftaleno 1'-(2-hidroxi-benceno-5-sulfonato de sodio). Este reactivo se disolvió en alcohol a una concentración 280 μM , además se utilizó un buffer de tetraborato de sodio 26 mM a pH 9. El desarrollo de color fue proporcional al magnesio presente y después de 30 min de incubación a temperatura ambiente se efectuó la lectura a 505 nm. Los valores obtenidos se extrapolaron de una gráfica de unidades de densidad óptica (u.D.O.) vs μ moles de magnesio, para ello se utilizó una solución estándar de $MgCl_2$ 1mM. Los resultados correspondientes se ilustran en la Tabla VI de la sección de resultados.

g) DETERMINACION DEL POTENCIAL DE MEMBRANA.

El potencial de membrana se midió en el espectrofluorómetro (Aminco SPF 500) detectando los cambios de fluorescencia del bromuro de etidio a 530 nm (λ excitación) ventana 10 mm y 610 nm (λ emisión) ventana 10 nm. El procedimiento fue el siguiente: a 1 mg de mitocondrias incubadas en un medio que contenía succinato 10 mM, fosfato 10 mM, sacarosa 40 mM, Tris-HCl 10 mM a pH 7.3; se le adicionaron mersalil 10 μM (0, 2 min) y ADP 1.4 mM (0, 3 min) excepto en el caso del control. El tiempo de cada adición se indica entre paréntesis. El volumen final

fue de 3 ml. El bromuro de etidio se adicionó a todas las preparaciones a una concentración final de 100 μ M. Después de incubar dos min con este reactivo, la preparación se centrifugó en una microfuga durante 3 min. resuspendiendo el pellet en 0.2 ml de DSS al 5% y agregando 1.7 ml de agua bidestilada. Los valores obtenidos se extrapolaron de una curva de calibración de bromuro de etidio dada en unidades de fluorescencia vs nmolas de bromuro de etidio. Los cálculos del potencial se efectuaron a partir de la ecuación de Nernst, obteniendo la equivalencia de las nmolas de bromuro de etidio en mV. Los resultados se aprecian en la Tabla VII.

III.- RESULTADOS

Nuestra investigación sobre transporte de ADP, ATP, Ca^{2+} y K^+ se realizó en mitocondrias íntegras incubadas en un medio hipotónico. Este sistema permite detectar cualitativamente el movimiento de iones causado durante los cambios osmóticos. Otro aspecto importante fue estudiar el efecto del potencial de membrana durante el transporte de ADP, ATP y cationes en el sistema señalado.

Con estos elementos nuestra idea fue postular el o los mecanismos que expliquen el acoplamiento funcional de la ADP/ATP translocasa con el movimiento de cationes (Ca^{2+}) preservando la total o parcial electroneutralidad del sistema.

a) HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL POR ENTRADA DE Pi

Se sabe que en las mitocondrias incubadas en un medio hipotónico el influjo de cationes y aniones hacia la matriz mitocondrial induce un aumento en la osmolaridad interna, lo que provoca una entrada masiva de agua hacia el espacio intramitocondrial, misma que puede medirse espectrofotométricamente a 546 nm como una disminución de la densidad óptica, a este fenómeno se le conoce como hinchamiento mitocondrial.

La Figura 1 muestra el hinchamiento mitocondrial inducido por el transporte de Pi hacia la matriz del organelo (32) siendo el único sustrato el succinato (10 mM). Este hinchamiento depende de la entrada de Pi y agua y se demuestra porque al adicionar mersalil (10 μM), inhibidor de la entrada de Pi en mitocondrias, se bloquea la disminución en la densidad óptica. Sin embargo, cuando el mersalil se añade en la fase final del hinchamiento mitocondrial con la adición subsecuente de ADP (el intervalo entre la adición de mersalil y ADP es 1 min) se aprecia una amplia contracción mitocon-

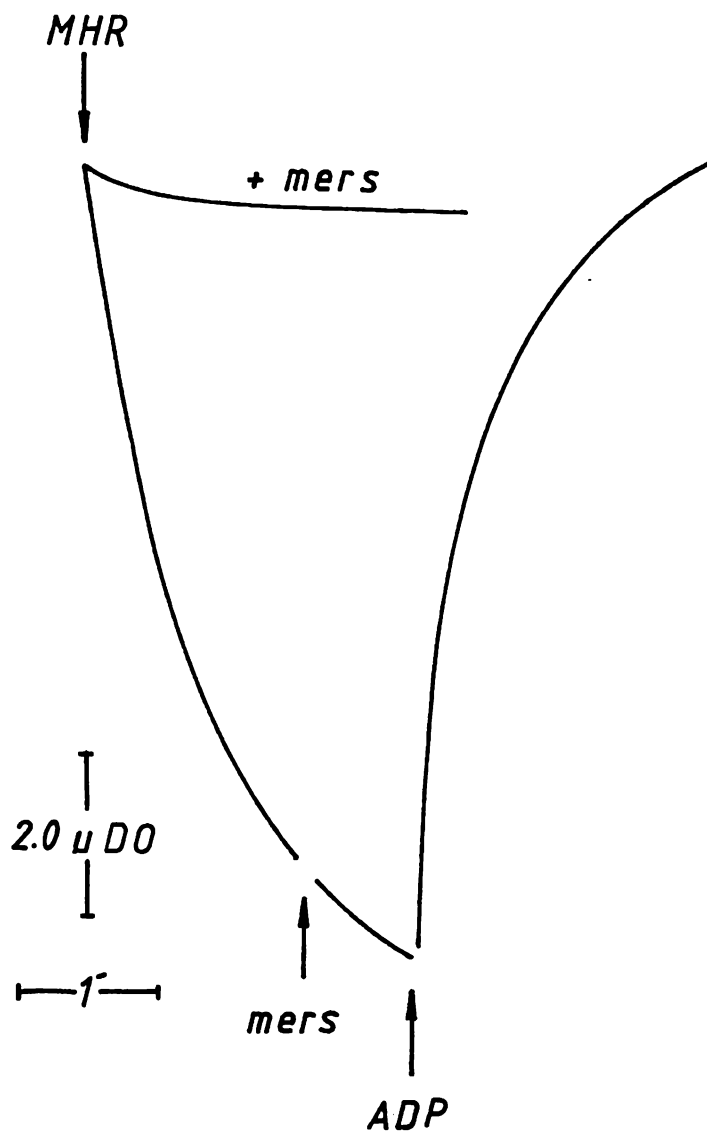


Figura 1.- EFECTO DEL MERSALIL EN EL HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL
 Mitocondrias de Hígado de rata (2 mg) ,se incubaron en el medio hipotónico que consistía de succinato 10 mM, fosfato 10 mM, sacarosa 40 mM, EDTA 0.1 mM y rotenona 10 μg , a pH 7.3. El volumen final fue de 3 ml. El mersalil (10 μM) se adicionó a los $t=0$ y 2 min después de iniciada la incubación; el ADP (1.4 mM) se adicionó 3 min después de iniciada la incubación. El registro espectrofotométrico se efectuó a 546 nm.

drial inducida por el nucleótido . Este aumento en la densidad óptica podría sugerir el eflujo de cationes de la matriz mitocondrial.

b) HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL DEPENDIENTE DE ENERGIA

Teniendo en mente la idea de investigar si el hinchamiento mitocondrial promovido por la entrada de fosfato es dependiente de energía se llevó a cabo el experimento ilustrado en la Figura 2. Con este experimento se demuestra que la adición de Antimicina A al medio de incubación inhibe por completo la disminución en la densidad óptica. Esto es razonable si se tiene en cuenta que la Antimicina A inhibe la oxidación de succinato y por lo tanto la formación de oxhidrilos indispensables para el transporte electroneuro de Pi^-/OH^- en mitocondrias (33).

En la Figura 2 también se ilustra que la sola adición de ADP al medio no promueve la contracción mitocondrial, por lo tanto es importante hacer hincapié en que la contracción mitocondrial sólo es producida por la adición de mersalil y ADP, sin importar el orden de adición.

Experimentos anteriores llevados a cabo por Stoner y Sirak (34) demostraron que la fijación de ADP a la translocasa de adenín nucleótidos induce una contracción mitocondrial sensible a atractilósido. Este experimento se realizó en condiciones no fosforilantes y los autores (34) atribuyen estos resultados a un cambio conformacional de las proteínas de la membrana interna mitocondrial promovido por el movimiento del translocador de ADP/ATP a través de la fase lipídica membranal.

c) CONTRACCION MITOCONDRIAL Y FOSFORILACION OXIDATIVA

Con el fin de conocer si en nuestros experimentos la contracción mitocondrial promovida por el ADP se debe a un cambio confor

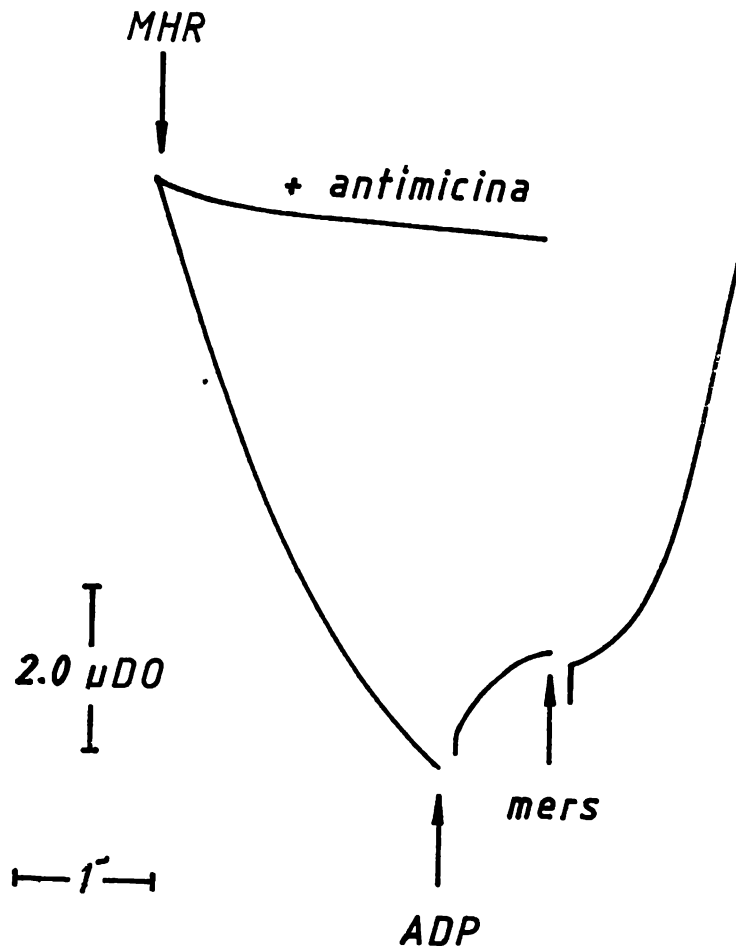


Figura 2.- DEPENDENCIA DE ENERGIA EN EL HINCHAMIENTO MITO-
CONDRIAL

Las condiciones experimentales son idénticas a las de la Figura 1. La adición de Antimicina A fue de 10 μg en el $t=0$; mersalil (mers) 10 μM a los 3 min y ADP 1.4 mM a los 2 min de iniciada la incubación con MHR (2mg). El volumen final fue de 3 ml. Los cambios en D.O. se registraron a 546 nm.

macional o bien a una salida de cationes resultantes del eflujo de ATP sintetizado a partir de ADP y Pi en presencia de mersalil, se decidió añadir oligomicina al medio de incubación. En la Fig 3 se puede apreciar que la adición de oligomicina inhibe la contracción mitocondrial dependiente de ADP-mersalil, esto explica que la contracción mitocondrial depende de la fosforilación oxidativa y no de cambios estructurales.

d) CONTRACCION MITOCONDRIAL SENSIBLE A ATRACTILOSIDO.

EFEECTO DEL FCCP.

La aseveración anterior se ve reforzada por el experimento ilustrado en la Fig. 4. Este experimento señala que la adición de atractilósido (40 μM) inhibe la contracción mitocondrial.

Por otro lado, la existencia de ATP en el exterior mitocondrial se demuestra indirectamente porque la adición de un desacoplante como el FCCP induce un nuevo hinchamiento mitocondrial como se ilustra en la Fig. 4.

La interpretación de los experimentos anteriores se representa en el Esquema 1. En este Esquema se indica que el hinchamiento mitocondrial producido por la adición de FCCP, se debe a la acumulación intramitocondrial del fosfato liberado por la hidrólisis de ATP, esta acumulación es causada por la inhibición del acarreador de $\text{Pi}^- / \text{OH}^-$ por el mersalil. El aumento en la concentración interna del fosfato, incrementa la carga negativa interna, misma que atrae electroforéticamente al catión, produciéndose el paso de agua hacia la matriz mitocondrial para equilibrar la osmolaridad a ambos lados de la membrana.

e) SINTESIS DE ATP

A partir de los resultados anteriores se pensó en la posibilidad de que se llevara a cabo la síntesis de ATP con las adi-

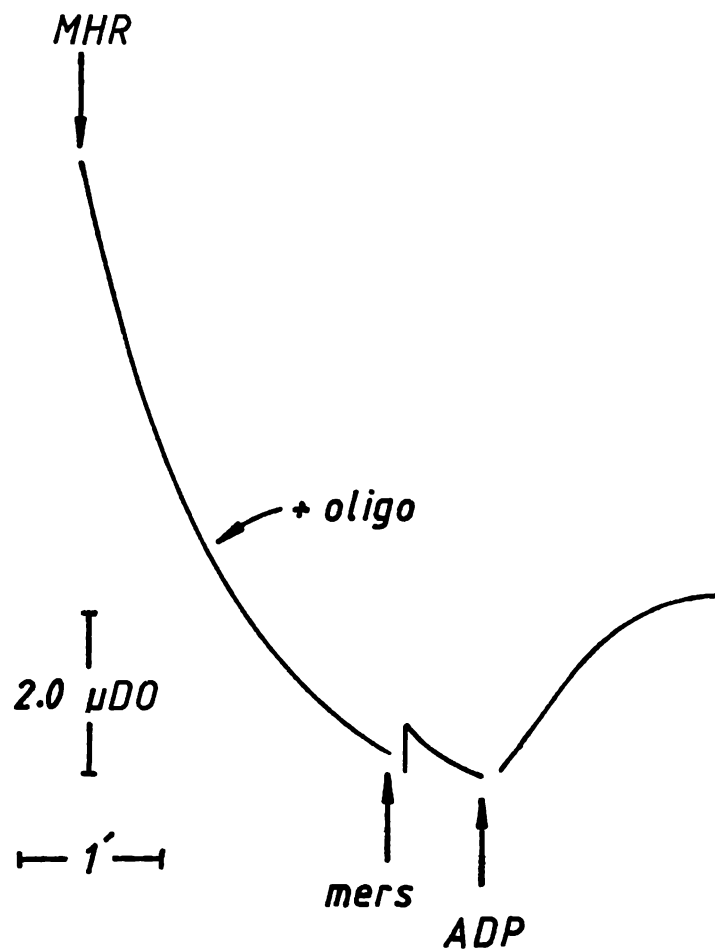


Figura 3.- EFEECTO DE LA OLIGOMICINA SOBRE LA CONTRACCION MITOCONDRIAL INDUCIDA POR ADP.

Las condiciones experimentales se describen en la Fig. 1. Las adiciones de 10 μ g de oligomicina en el $t=0$; mersalil (mers) 10 μ M a los 2 min. y ADP 1.4 mM a los 3 min. de iniciada la incubación con 2 mg de MHR. El volumen final fue de 3 ml. El registro de D.O. fue a 546 nm.

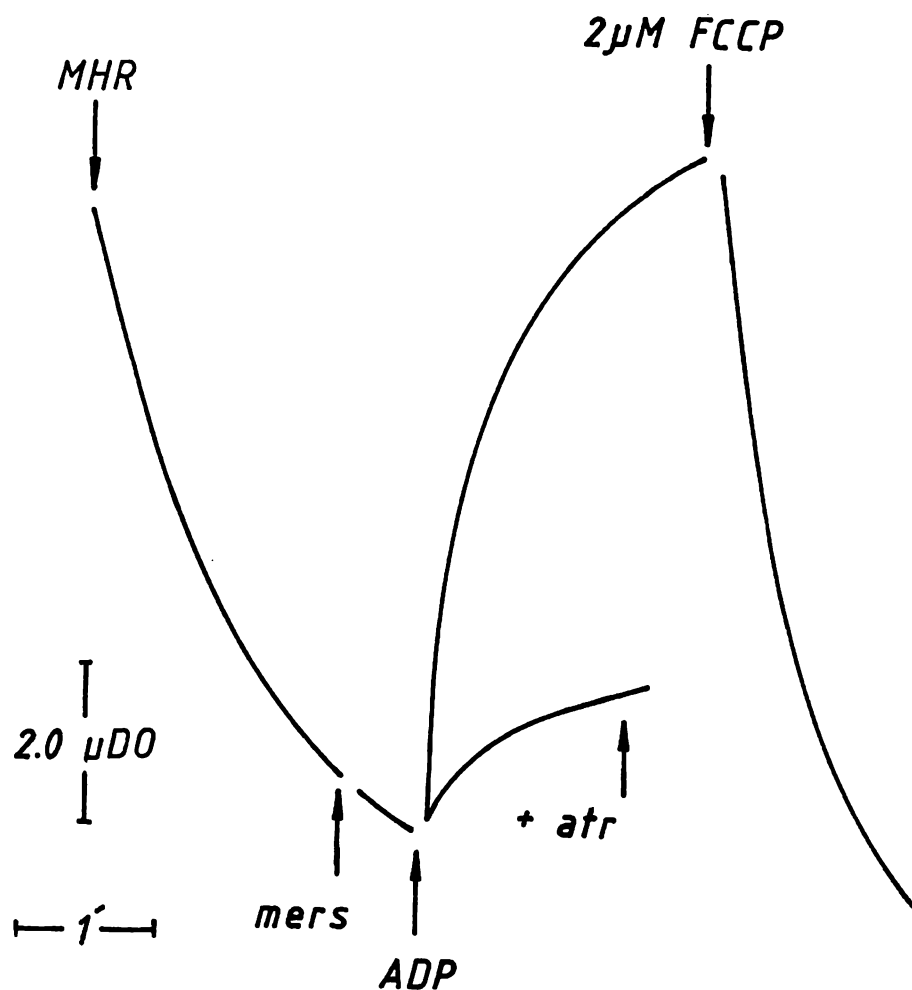
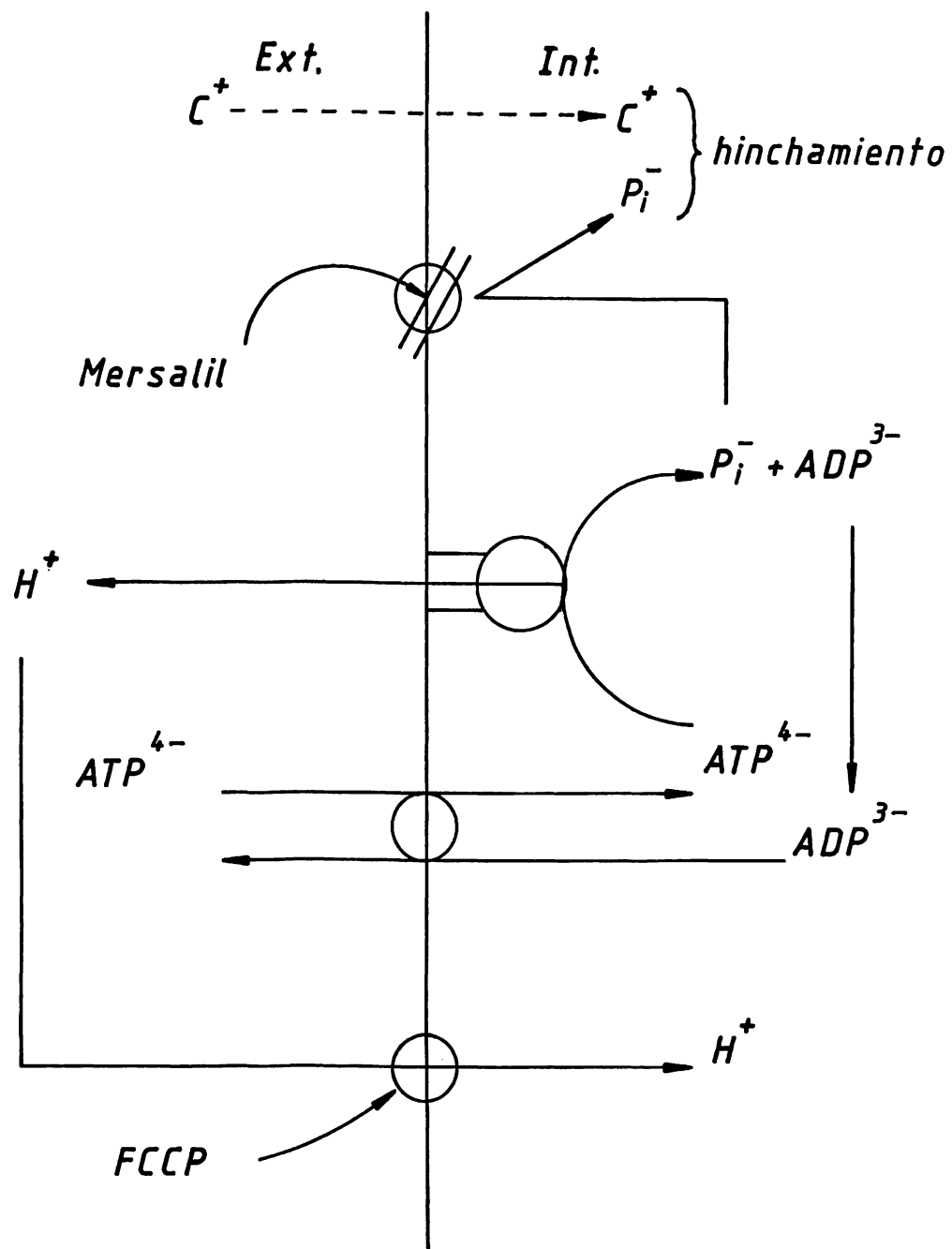


Figura 4.- ACCION DEL ATRACTILOSIDO Y DEL FCCP EN LA CONTRACCION Y EN EL HINCHAMIENTO MITOCONDRIAL.

El desarrollo experimental fue como en la Figura 1. Las adiciones de atractilósido (atr) 40 μM y FCCP 2 μM se efectuaron al inicio ($t=0$) de la incubación y en el punto máximo de la contracción, respectivamente. El volumen final fue de 3 ml y la incubación se inició con 2 mg de MHR. El registro espectrofotometrico fue a 546 nm.



ESQUEMA 1

ciones de ADP y Pi, aún en presencia de mersalil, inhibidor del transporte de Pi, adicionado en la fase final del hinchamiento. Por lo tanto, con el fin de demostrar la síntesis de ATP en estas condiciones, se llevaron a cabo los experimentos mostrados en la Tabla II. El experimento (1) de esta tabla indica que la cantidad de ATP formada cuando se añaden ADP y mersalil, en este orden, es parecida a la encontrada cuando se añade ADP únicamente. Sin embargo, cuando el orden de adición se invierte, es decir primero el mersalil y posteriormente el ADP, la cantidad de ATP sintetizado es menor, aunque ciertamente mayor que en el control. Esto podría explicarse porque durante el tiempo que transcurre entre la adición de ADP primero y mersalil después, aún podría entrar fosfato a las mitocondrias, lo que no ocurre cuando el orden de adición es mersalil seguido por ADP.

Por otro lado, es de interés señalar que el atractilósido (Exp. 2, Tabla II) no inhibe totalmente el transporte de ADP (hacia el interior de la mitocondria) ya que aún en presencia de 40 μ M de este inhibidor de la translocasa de ADP/ATP, se lleva a cabo la síntesis de ATP, aunque esta se realice en una proporción menor de la que aparentemente se requiere para apoyar la contracción mitocondrial, la cual resulta inhibida como se ilustra en la Fig. 4. Es posible explicar el hecho de que se lleve a cabo la síntesis de ATP en presencia de atractilósido debido al carácter de inhibidor competitivo del transporte de adenín nucleótidos que tiene este glicósido.

f) MOVIMIENTO DE K^+

Tomando en cuenta que el K^+ es el catión más abundante en el interior de las mitocondrias (120-140mM), se supuso que la contracción mitocondrial inducida por el par mersalil-ADP

TABLA II.- EFEECTO DEL MERSALIL Y EL ATRACTILOSIDO SOBRE LA FOSFORILACION OXIDATIVA PARCIALMENTE DEPENDIENTE DE LA CONTRACCION MITOCONDRIAL.

<u>Adiciones</u>	<u>nmolas de ATP/mg</u>
<u>Exp. 1</u>	
Control	133
Mersalil (o)	125
ADP (o)	1164
Mersalil-ADP (2) (3)	623
ADP-Mersalil (2) (3)	1036
<u>Exp. 2</u>	
ATR (o)	130
ATR-Mersalil (o) (2)	136
ATR-ADP (o) (2)	752
ATR-Mersalil-ADP (o) (2) (3)	666

En los experimentos 1 y 2 las adiciones de mersalil 10 μ M, ADP 1.4 mM y ATR 40 μ M se efectuaron en el tiempo (min) indicado entre paréntesis. Para cada ensayo se utilizaron 2 mg de mitocondrias íntegras incubadas en el medio hipotónico descrito en la Fig 1. La determinación de ATP (27) se efectuó en 2 ml del sobrenadante obtenido como se detalla en materiales y métodos. La reacción se inició con 4.8 μ moles de NADP para el ensayo en el sistema de hexocinasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. La reducción de NAD se midió a 340 nm en el espectrofotómetro. Los datos obtenidos se extrapolaron de una curva de D.O. contra concentración de NADH.

podría ser debida a la liberación de K^+ en un cotransporte $ATP^{4-} K^+$ con el propósito de corroborar esta suposición, decidimos determinar la salida de K^+ intramitocondrial utilizando el isótopo radioactivo ^{86}Rb que tiene un comportamiento similar al de K^+ . Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla III; como puede observarse, la adición del par mersalil-ADP indujo la liberación del rubidio en un 45%. Sin embargo, el mersalil per se es capaz de producir el eflujo de rubidio intramitocondrial en un 42%, esto último está de acuerdo con los resultados obtenidos por Brierley y Cols. (35) que demuestra que el mersalil induce la liberación de K^+ intramitocondrial.

La dependencia de rubidio para la salida de ATP en presencia de mersalil para mantener la electroneutralidad del sistema se explicaría porque en el cotransporte de ATP-Rb se intercambiarían 3 cargas negativas netas hacia el exterior, 4 negativas del ATP y 1 positiva del Rb, por 3 cargas negativas del ADP entrante. Esto último estaría de acuerdo con los estudios de Meisner (36, 37) que señalan el transporte compensador de carga de protones y cationes en la translocación de ADP/ATP.

Por otro lado, es importante hacer notar que la sola adición de ADP provoca la salida del 48% del rubidio intramitocondrial (Tabla III). Posiblemente debido a un mecanismo electroforético.

g) MOVIMIENTO DE Ca^{2+}

Debido a los datos obtenidos con el rubidio, decidimos explorar el papel de otros cationes en el fenómeno de la contracción mitocondrial producida por la acción de mersalil-ADP.

Los resultados de este experimento se ilustran en la Fig. 5. En esta figura se puede apreciar el efecto del EGTA o EDTA

TABLA III.- INFLUENCIA DEL MERSALIL Y EL ADP SOBRE LA LIBERACION MITOCONDRIAL DE ⁸⁶Rb.

<u>Adiciones</u>	<u>nmolas ⁸⁶Rb/mg</u>	<u>% Rubidio liberado</u>
Control	309	-
Mersalil (o)	180	42
Mersalil-ADP (2) (3)	170	45
ADP (o)	160	48

El procedimiento de marcaje con ⁸⁶Rb de las mitocondrias de hígado de rata y el desarrollo experimental se describen en materiales y métodos. 2.5 mg de mitocondrias + ⁸⁶Rb se incubaron en un medio que contenía glutamato 10 mM, malato 10 mM, fosfato 10 mM, sacarosa 40 mM, pH 7.3. El volumen final fue 3 ml. Las adiciones de mersalil 10 µM y ADP 1.4 mM se efectuaron en los tiempos indicados entre paréntesis. El tiempo total de incubación fue de 5 min. La reacción se paró por filtración (Millipore, tamaño 0.45 µM) y la radioactividad en el filtro se contó con el Contador de Centelleo Mark II.

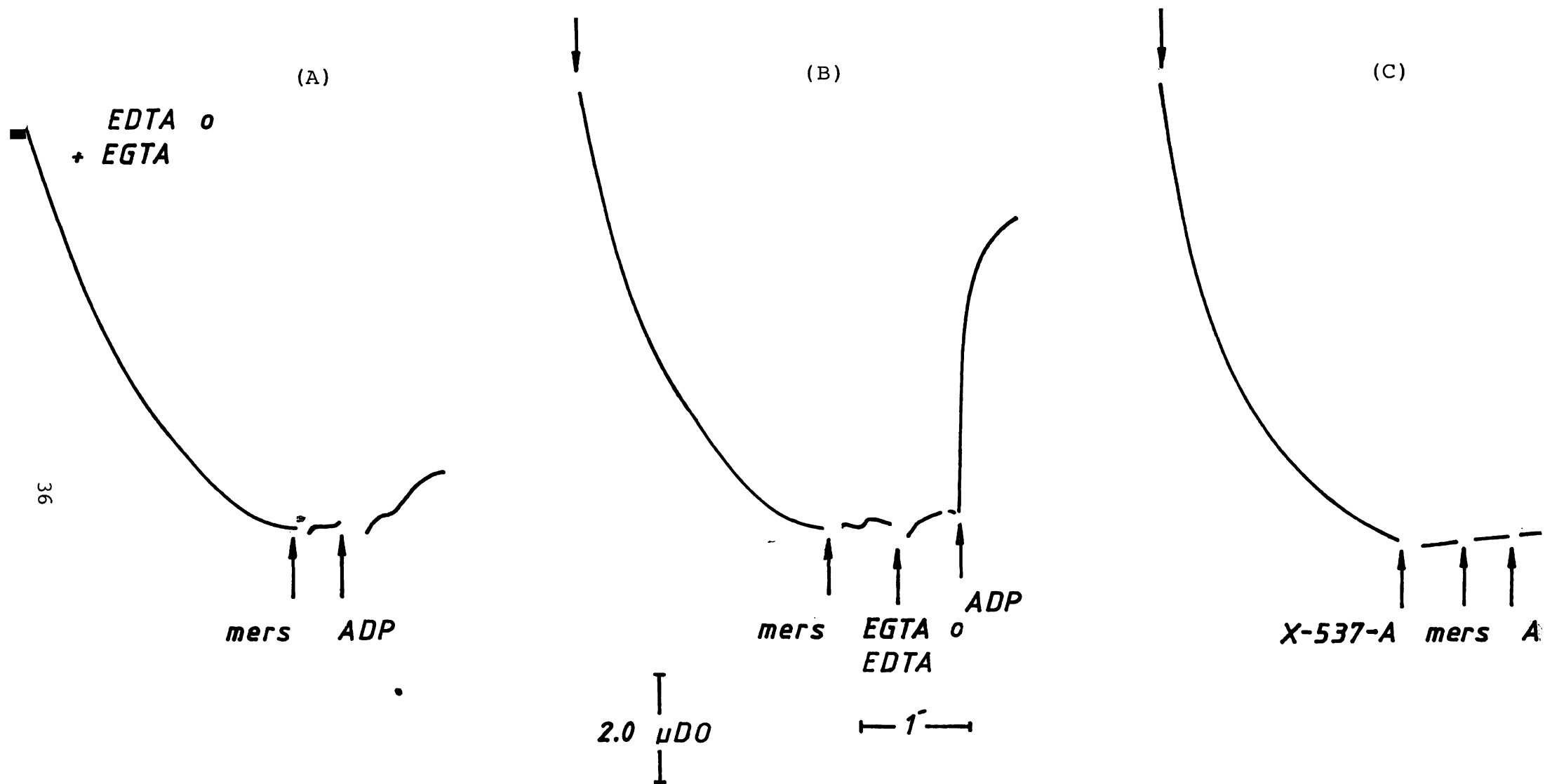


Figura 5.- EFEECTO DEL EDTA o EGTA Y DEL X-537A EN LOS CAMBIOS OSMOTICOS MITOCONDRIALES.
 El desarrollo experimental se detalla en la Fig. 1. Las adiciones de EDTA o EGTA 500 μ M y X537A 1×10^{-4} mM se efectuaron en los tiempos indicados en la figura. Los cambios en D.O. se registraron a 546 nm.

500 μM sobre el transporte de Ca^{2+} en el sistema de hinchamiento y contracción mitocondrial. La adición de cualquiera de estos agentes quelantes al medio de incubación en el $t=0$, provocó la inhibición casi total de la contracción mitocondrial (Fig. 5A). Sin embargo, la inhibición es menor cuando el quelante se añade enseguida del mersalil (Fig. 5B).

La diferencia en el efecto inhibitorio se podría explicar por el tiempo de incubación que transcurre entre estas adiciones del quelante. Estos resultados están de acuerdo con los datos de Wherle y Cols. (38) cuando encontraron inhibición de la contracción mitocondrial por la adición de EDTA.

Es interesante hacer notar que si la salida de Ca^{2+} es mediada por un agente ionóforo como el X-537A, no se observa contracción mitocondrial (Fig. 5C), esta adición se efectuó hacia la fase final del hinchamiento. En la Tabla IV se aprecia salida de Ca^{2+} intramitocondrial cuando se adicionan mersalil y ADP además del antibiótico; una posible explicación sería que la salida del Ca^{2+} por el ionóforo no se acompaña de salida de agua y sólo se ve contracción mitocondrial cuando sale el ATP sintetizado por la ATP-sintetasa acompañado del Ca^{2+} .

La importancia de los cationes divalentes en el fenómeno de la contracción mitocondrial es reforzada por los resultados experimentales de la Figura 6 (A,B). Estos datos indican que la adición de dos inhibidores del transporte de Ca^{2+} : rojo de rutenio y Lantano provocaron inhibición de la contracción inducida por mersalil-ADP.

Cuando se determinó ATP en las preparaciones que contenían X-537A, EGTA o EDTA y rojo de rutenio se encontró una disminución en la síntesis de ATP en relación con los resultados obtenidos

TABLA IV.- DETERMINACION FLAMOMETRICA DE LA LIBERACION DE CALCIO.

<u>Adiciones</u>	<u>nmolas de salida de Ca²⁺ / mg</u>
Control	10
Mersalil-ADP	34
(2) (3)	
X-537A	10
(o)	
Mersalil-X537A-ADP	33
(2) (3) (4)	

Los ensayos de hinchamiento y contracción mitocondrial se realizaron siguiendo el modelo experimental de la Fig. 1. El volumen final fue de 3 ml. Las adiciones de mersalil 10 μ M, ADP 1.4 mM y X-537A 1×10^{-4} se realizaron en los tiempos indicados entre paréntesis tomando en cuenta que la incubación se inicia con 2 mg de MHR. La determinación del Ca²⁺ liberado se describe en la sección de materiales y métodos. El tiempo total de incubación fue de 5 min.

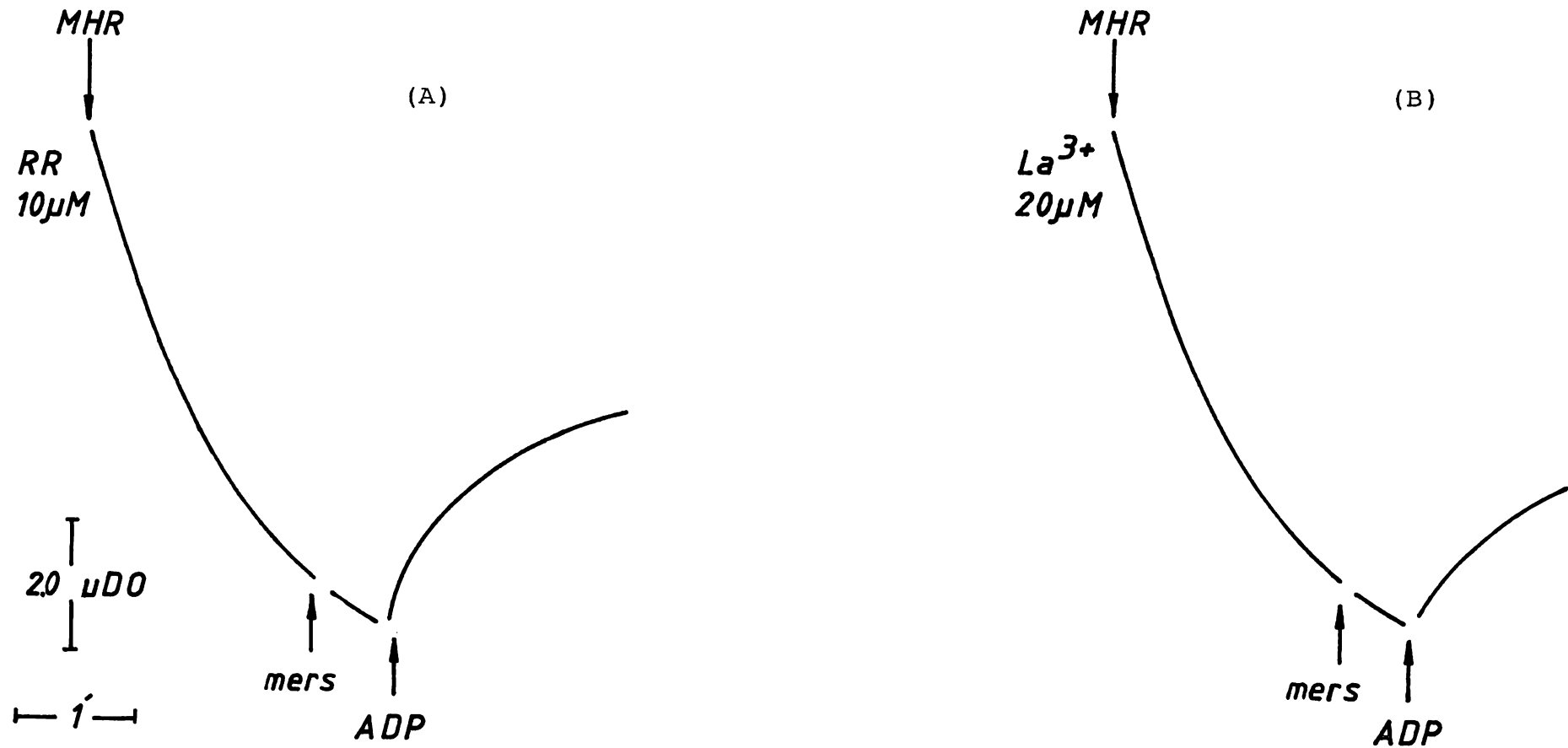


Figura 6.- ACCION DEL ROJO DE RUTENIO (RR) Y LANTANO (La³⁺) SOBRE LA CONTRACCION MITOCON-
INDUCIDA POR ADP

Las mitocondrias de hígado de rata (2mg) se incubaron como se describe en la Fig.1 adicio-
nando RR 10 μM y La³⁺ 20 μM al inicio de la incubación. El mersalil 10 μM se adicionó
2 min después y el ADP 1.4 mM 3 min después de iniciada la incubación. El volumen final
fue 3 ml. El cambio en D.O. se efectuó a 546 nm.

cuando al medio se añade únicamente mersalil y ADP (Tabla V).

Nuevamente estos datos sugieren que debe sintetizarse una cantidad determinada de ATP para poder observar la contracción mitocondrial.

El antibiótico clorotetraciclina (CTC) (29-31) se ha utilizado para monitorear cationes divalentes en la fase acuosa o hidrófoba, al formarse el complejo clorotetraciclina - catión divalente. La transición del complejo hacia la fase hidrófoba da una señal fluorescente alta. Tomando en cuenta los resultados de la Figura 7 (A,B,C) se infiere que el ADP induce la movilización de Ca^{2+} o Mg^{2+} hacia una fase acuosa y esto se observa cuando el ADP se añade al medio que contiene mersalil (Fig. 7A). Cuando los agentes quelantes EGTA o EDTA se añaden al medio de incubación el efecto del ADP desaparece. Sin embargo cuando EGTA o EDTA se adicionan entre mersalil y ADP, el efecto del ADP no se modifica.

h) MOVIMIENTO DE Mg^{2+}

Con el objeto de dilucidar si el magnesio también participa en el fenómeno osmótico (contracción mitocondrial) se cuantificó el magnesio liberado. Los resultados de la Tabla VI señalan que en las mitocondrias tratadas con mersalil y mersalil-ADP la variación en la concentración de magnesio intramitocondrial es mínima y al compararse estos datos con el control se encuentra que no existe eflujo de magnesio durante la contracción mitocondrial.

i) EFFECTO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EN EL FENOMENO OSMOTICO MITOCONDRIAL

En este momento del trabajo experimental se consideró interesante conocer la posible relación entre la salida de cationes intramitocondriales y el potencial de membrana ya que como ha sido postulado por Brierley y Cols. (39), el potencial de membrana

TABLA V.- EFECTO DE EGTA Y EL ROJO DE RUTENIO EN LA SINTESIS DE ATP.

<u>Adiciones</u>	<u>nmolas ATP/mg</u>
Control	146
Mersalil-ADP	509
(2) (3)	
EGTA-Mersalil-ADP	430
(o) (2) (3)	
Mersalil-EGTA-ADP	427
(2) (3) (4)	
Mersalil-X-537A. ADP	459
(2) (3) (4)	
RR-Mersalil-ADP	459
(o) (2) (3)	

La metodología para cuantificación de ATP se detalla en la sección de materiales y métodos. La incubación se inició con 2 mg de MHR en el medio hipotónico descrito en la Fig 1. El volumen final fue de 3 ml. Las adiciones de mersalil 10 μM , ADP 1.4 mM, EGTA 500mM, X-537A 1×10^{-4} mM y rojo de rutenio (RR) 10 μM se efectuaron en los tiempos indicados entre paréntesis y en el orden en el que aparecen. El tiempo total de incubación fue de 5 min.

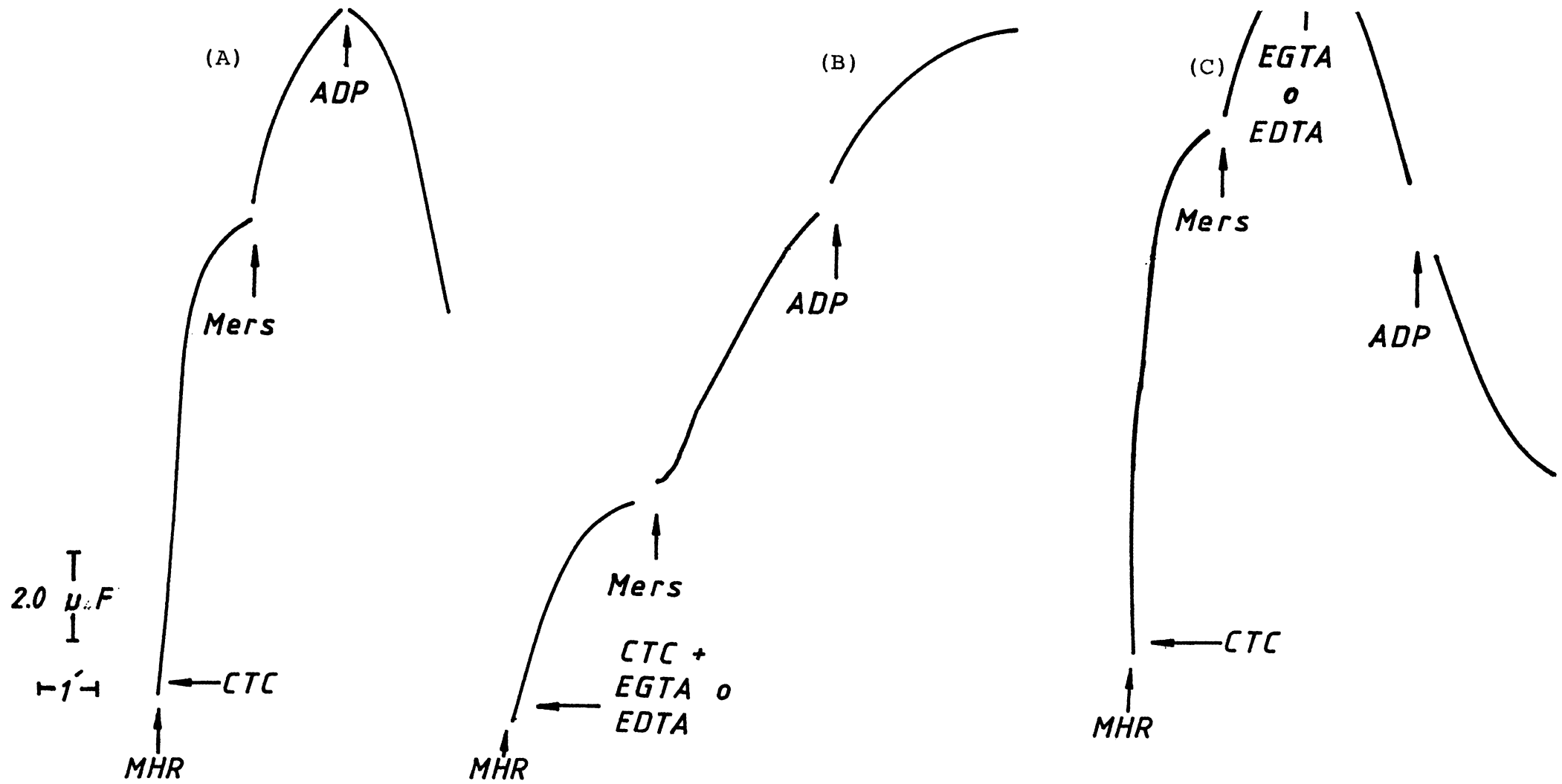


Figura 7.- INFLUENCIA DE AGENTES QUELANTES SOBRE EL MOVIMIENTO DE CATIONES DIVALENTES
 2 mg de MHR se incubaron como se describe en la Fig. 1. El EGTA 500 μ M, mersalil 10 μ M y ADP 1.4 mM se adicionaron como se indica en los trazos. La clorotetraciclina (CTC) (30 μ g) se añadió al inicio de la incubación. Los cambios de fluorescencia (F) se siguieron en un espectrofluorómetro a 380 nm (λ de excitación) y 525 nm (λ de emisión) y ventanas de 4 y 5 nm, respectivamente.

TABLA VI.- CONCENTRACION INTRAMITOCONDRIAL DE Mg²⁺

<u>Adiciones</u>	<u>nmolas de Mg²⁺/mg</u>
Control	38
Mersalil	31
(o)	
ADP	27
(o)	
Mersalil-ADP	27
(2) (3)	

El desarrollo experimental fue similar al de la Fig 1 efectuando las adiciones de mersalil 10 μ M y ADP 1.4 mM en los tiempos indicados entre paréntesis. El tiempo total de incubación fue 5 min y al cabo de este, cada ensayo se centrifugó a 10 000 rpm (Sorvall RC 5B rotor SS34) durante 10 min y en 1 ml del sobrenadante se determinó el Mg²⁺ liberado como se describe en materiales y métodos. Para la determinación espectrofotométrica a 505 nm se utilizó una solución estándar de MgCl₂ 1 mM. Los resultados se extrapolaron de una curva de calibración para Mg²⁺.

regula la osmolaridad mitocondrial dependiente del transporte iónico.

Los resultados de nuestro experimento mostrados en la Tabla VII señalan un aumento electronegativo del potencial de membrana con la adición de mersalil, esto podría deberse a la acumulación de Pi en el interior de las mitocondrias, el cual está cargado negativamente; cuando se añade ADP el potencial no se modifica en relación al control, puesto que el potencial generado es gastado para la síntesis de ATP. Sin embargo, la adición del par mersalil-ADP induce un potencial más electronegativo que el ADP solo, esto podría deberse a la salida de cargas positivas de la matriz mitocondrial.

Con los resultados anteriores es posible postular que existe uno o varios mecanismos que acoplados a la adenín nucleótido translocasa movilizan cationes (Ca^{2+}) hacia el exterior de las mitocondrias, en condiciones en las que debe preservarse la parcial electroneutralidad durante la translocación de ADP/ATP. La salida de Ca^{2+} sugiere que este catión es el más probable ya que la contracción mitocondrial resulta inhibida con las adiciones de X-537A, Lantano y rojo de rutenio.

TABLA VII.- EFECTO DEL MERSALIL Y EL ADP SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.

<u>Adiciones</u>	<u>ΔE (-mv)</u>
Control	138
Mersalil	184
(o)	
ADP	143
(o)	
Mersalil-ADP	174
(2) (3)	

La determinación del potencial de membrana se describe en materiales y métodos. La incubación de 2 mg de MHR en el medio hipotónico descrito en la Fig 1 se efectuó durante 5 min. La incubación con bromuro de etidio 100 μ M en cada ensayo se realizó durante 2 min, parando la reacción por centrifugación en la microfuga durante 3 min. La determinación se efectuó en el precipitado solubilizado en 0.2 ml de DSS al 5% agregando 1.7 ml de H₂O bidestilada. La fluorescencia se midió a λ_{exc} 530 nm y λ_{em} 610 nm en un espectrofluorómetro. Los valores se extrapolaron de una curva de calibración de bromuro de etidio y los cálculos del potencial se efectuaron utilizando la ecuación de Nernst.

IV.- DISCUSION

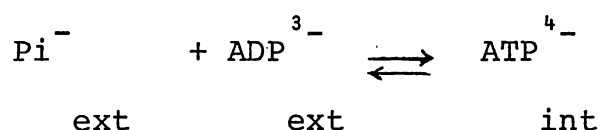
El objetivo de este estudio fue postular uno o varios mecanismos en el que el acople funcional de la ADP/ATP translocasa, el acarreador de Pi y el movimiento de cationes (Ca^{2+}) expliquen la parcial o total electroneutralidad que prevalece durante la translocación de los adenín nucleótidos mitocondriales.

Los resultados obtenidos en nuestra investigación coinciden con el reporte previo de Mc. Givan y Cols. (22) en el cual sugieren una estrecha relación funcional entre la ADP/ATP translocasa y el acarreador de Pi.

La Tesis propuesta se basa en los resultados obtenidos en las mitocondrias tratadas con el inhibidor del transporte de Pi, mersalil, más el adenosín-difosfato y sugieren que la salida del ATP sintetizado requiere del cotransporte de un catión (Ca^{2+}).

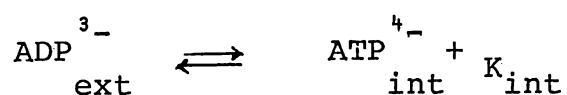
Los experimentos de Fonyo y Besman (40) demostraron que la adición de mersalil a mitocondrias inhibe la fosforilación oxidativa; se sabe que la inhibición por mersalil se debe al bloqueo de los grupos sulfhidrilo presentes en el sitio activo del acarreador de Pi, esta inhibición depende de la concentración de H^+ , es decir durante el transporte de Pi^{2-} el acarreador específico requiere de la interacción de 1 o 2 H^+ con el sitio activo para que se lleve a cabo el intercambio electroneutro Pi^{2-} , H^+ / OH^- (41). Sin embargo, los resultados de esta Tesis muestran que en las condiciones experimentales utilizadas no existe inhibición de la fosforilación oxidativa ya que el mersalil se añadió al final del hinchamiento mitocondrial, es decir cuando el fosfato ya se había acumulado en la matriz, realizándose la síntesis de ATP a partir del ADP, adicionado posteriormente al mer-

salil y del Pi intramitocondrial. En el trabajo de Mc Givan y Cols (22) se demostró que la N-etilmaleimida, otro reactivo específico para grupos - SH, no inhibe la incorporación oxidativa del Pi intramitocondrial al ADP, pero la síntesis de ATP se ve limitada por la descompensación de cargas durante el transporte de adenín nucleótidos, en el cual estos autores proponen el siguiente intercambio:



El mecanismo anterior se caracteriza por su total electroneutralidad, en este punto existe gran controversia ya que otros mecanismos postulan parcial electroneutralidad durante el transporte de ADP, ATP (23,42).

Por otro lado, Chávez (24) ha demostrado que la carga interna mitocondrial controla la entrada de ATP, ya que el movimiento de sustratos, como el succinato, hacia el interior de la mitocondria aumenta la carga negativa interna que impide la entrada de ATP^{4-} . El que en estas condiciones experimentales se eleve la síntesis de ATP, aún en presencia de mersalil, se explica por el efecto de compensación de cargas, ya que si el ATP sale de las mitocondrias, requiere del cotransporte de un catión (K^+) para mantener la electroneutralidad del intercambio.



Lo anterior está de acuerdo con los datos reportados por Rossi y Azzone (21) quienes demostraron que la síntesis de ATP inducida por un gradiente de K^+ en presencia de valinomicina, no se inhibe, ya que como se explicó en el párrafo anterior,

existe compensación de cargas por el potasio interno, durante el antitransporte $ADP^{3-}_{ext} \rightleftharpoons ATP^{4-}_{int}$

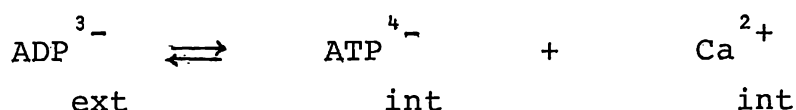
Por otro lado, Moreno (43) reportó que el calcio intramitocondrial al inducir una disminución en la concentración de adenín nucleótidos de la matriz, disminuye la velocidad de recambio de éstos a través de la translocasa y en consecuencia la velocidad de la fosforilación oxidativa.

Pfaff y Klingenberg (20) al estudiar el efecto de los cationes sobre el intercambio ADP/ATP, atribuyen al Ca^{2+} o Mg^{2+} un efecto estimulador sobre el transporte de adenín nucleótidos.

Los estudios anteriores junto con otros reportes de la literatura (44-46) hacen hincapié en el papel relevante del calcio en la translocación de ADP/ATP y en la fosforilación oxidativa.

En este sentido, nuestros resultados experimentales indican que el rojo de rutenio, el lantano, el EGTA o EDTA y el X-537A inhiben la contracción mitocondrial inducida por mersalil-ADP, sin embargo la síntesis de ATP ocurre en cada uno de los casos señalados.

Respecto a la acción inhibitoria que estos agentes tienen sobre el Ca^{2+} , nuestros datos sugieren que el Ca^{2+} está directamente involucrado en el fenómeno osmótico y en la salida de ATP intramitocondrial según el siguiente mecanismo:



En el mecanismo propuesto, la electrogenicidad del transporte de adenín nucleótidos aumenta el potencial interno electro-

negativo como se demostró en el experimento con bromuro de etidio sugiriendo la salida de cationes que dejarían el interior de la mitocondria más negativo.

Este mecanismo, también podría sugerir de acuerdo a nuestros datos experimentales que la relación estequiométrica de $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}^{4-}$ requeriría el eflujo de 14.9 Ca^{2+} por cada ATP transportado al exterior, pero esto también implicaría que si el intercambio $\text{ADP}^{3-}/\text{ATP}^{4-}$ vía translocasa es 1:1 se requeriría del cotransporte de H^+ que sin recambiarse estequiométricamente con el Ca^{2+} le darían la característica de parcial electrogenicidad.

La participación de cationes en los movimientos de ADP y ATP a través de la membrana interna mitocondrial está muy documentada. Aparte de este estudio, existen bastantes evidencias en la literatura sobre la participación de cationes en el funcionamiento de la ADP/ATP translocasa (36,37,44-46). Sin embargo, poco se ha hecho para tratar de demostrar una interacción física entre el acarreador de ADP/ATP y transportadores de cationes.

V.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ernster, L. y Schatz, G. (1981) *J. Cell Biol.* 91: 227s-255s.
- 2.- Chappell, J.B. (1968) *Br. Med. Bull* 24: 150-157
- 3.- Chappell, J.B. y Haarhoff, K.M. (1966) *Biochemistry of Mitochondria* (Slater, E.C., Kaniuga, Z., Wojtczak, L., Ed) 75-92 New York : Academic.
- 4.- Pfaff, E., Klingenberg, M. Ritt, E. y Vogell, W. (1968) *Eur. J. Biochem.* 5: 222-232
- 5.- Parsons, D.F. y Yano, Y. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 135: 362-364
- 6.- Mitchell, P. (1976) *Biochem. Soc. Trans.* 4: 399-430
- 7.- Nicholls, D.G. (1974) *Eur. J. Biochem.* 50: 305-315
- 8.- Padan, E. y Rottenberg, H. (1973) *Eur. J. Biochem* 40: 431-437.
- 9.- Mc Givan, J.D. y Klingenberg, M. (1971) *Eur. J. Biochem.* 20: 392-399
- 10.- Klingenberg, M. (1979) *Trends in Biochemical Sciences* 4: 249-252
- 11.- Klingenberg, M., Riccio, P. y Aquila, H. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 503: 193-210
- 12.- Klingenberg, M. (1980) *J. Memb. Biol.* 56: 97-105
- 13.- Klingenberg, M. (1982) *Membranes and Transport* (Martonosi, A. Ed) 1: 203-209 Plenum Publishing Corporation.
- 14.- Klingenberg, M. Hackenberg, H. Eisenreich, G. y Mayer, I (1979) *Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport* (Quagliariello, E, et al, Eds) 291-303 Elsevier North Holland, Amsterdam.

- 15.- Hackenberg, H. y Klingenberg, M. (1980) *Biochemistry* 19: 548-555.
- 16.- Klingenberg, M. y Heldt, H.W. (1982) *Metabolic Compartmentation* (Sies, H., Ed) 101-122 Academic Press. London.
- 17.- Klingenberg, M., Hackenberg, H., Kräsmer, R., Lin, C.S. y Aquila, H. (1980) *Annals of the New York Academy of Sciences* 358: 83-95
- 18.- Buchanan, B.B. Eiermann, W., Riccio, P., Aquila, H. y Klingenberg, M. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2280-2284
- 19.- Krämer, R. y Klingenberg, M. (1982) *Biochemistry* 21: 1082-1089.
- 20.- Pfaff E. y Klingenberg, M. (1968) *Eur. J. Biochem.* 6: 66-79
- 21.- Rossi, E. y Azzone, G.F. (1970) *Eur. J. Biochem.* 12: 319-327
- 22.- Mc Givan, J.D., Grebe, K. y Klingenberg, M. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 45: 1533-1541.
- 23.- Wulf, R., Kalstein, A. y Klingenberg, M. (1978) *Eur. J. Biochem.* 82: 585-592.
- 24.- Chávez, E. (1973) *FEBS Letters* 33: 129-131
- 25.- Schneider, W.C. y Hogeboom, G.N. (1962) *J. Biol. Chem* 183: 123-128
- 26.- Claude, A. (1946) *J. Exp. Med.* 84: 51-89
- 27.- Bergmeyer, H., Ed. (1965) *Methods of Enzymatic analysis* Academic Press. New York.
- 28.- Caswell, A.H. y Pressman, B.C. (1972) *Biochem Biophys. Res. Comm.* 49: 292-298
- 29.- Caswell, A.H. y Hutchison, J.D. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Comm* 42: 43-49
- 30.- Binet, A. y Volfin, P. (1975) *FEBS Letters* 49: 400-403

- 31.- Luthra, R. y Olson, M.S. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 191: 494-502.
- 32.- Vághy, P.L., Matlib, M.A. y Schwartz, A. (1981) Biochem Biophys. Res. Comm. 100: 37-44
- 33.- Slater, E.C., Lee, C.P. Berden, J.A. y Wegdam, H.J. (1970) Biochim. Biophys. Acta 223: 354-364.
- 34.- Stoner, C.D. y Sirak, H.D. (1973) J. Cell Biol. 56: 51-64.
- 35.- Brierley, G.P., Knight, V.A. y Settlemire, C.T. (1968) J. Biol. Chem. 243: 5035-5043
- 36.- Meisner, H. (1971) Biochemistry 10: 3485-3491
- 37.- Meisner, H. y Klingenberg, M. (1968) J. Biol. Chem. 243: 3631-3639
- 38.- Wherle, J.P., Jurkowitz, M., Scott, K.M. y Brierley, G. P. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 174: 312-323
- 39.- Brierley, G.P., Jurkowitz, M., Chávez, E. y Jung D. (1977) J. Biol. Chem. 252: 7932-7939.
- 40.- Fonyo, A. y Bessman, S.P. (1966) Biochem. Biophys. Res. Comm. 24: 61-66.
- 41.- Tyler, D.D. (1968) Biochem. J. 107: 121
- 42.- Klingenberg, M. (1970) Essays Biochem. 6: 119-59
- 43.- Moreno, R. (1983) Biochim. Biophys. Acta 724: 278-285
- 44.- Zoccarato, F., Rugolo, M., Siliprandi, D. y Siliprandi, N. (1981) Eur. J. Biochem. 114: 195-199
- 45.- Siliprandi, D., Siliprandi, N. y Toninello, A. (1983) Eur. J. Biochem. 130: 173-175
- 46.- Hillered, L., Murchiri, P.M., Nordebrand, K y Ernster, L. (1983) FEBS Letters 154: 247-250



RECIPROCAL INTERACTIONS OF PROGESTERONE AND 17 α -OH-PROGESTERONE AS EXOGENOUS SUBSTRATES OF RAT ADRENAL 21-HYDROXYLASE

Z. ORTA-FLORES, J. M. CANTÚ and O. V. DOMÍNGUEZ

Division of Biochemistry and Section of Genetics, Research Department on Experimental Medicine,
I.M.S.S., P.O. Box 73-032, México 73, D.F., Mexico

(Received 10 August 1976)

SUMMARY

Due to the small concentration and activity of 17 α -hydroxylase present in the rat adrenal, the main corticoids secreted in the rat are DOC, B_k , A_k , 18-OH-DOC and aldosterone, formed directly from progesterone (I). Because of the limited amounts of 17 α -OH-progesterone (II) available, the biosynthesis of S_R , F_k and E_k is restricted. Since 21-OH steroid hydroxylase (21-OH-ase) uses both I and II in corticoid biosynthesis in other species, it was considered of interest to study the comparative interactions which could exist between these two precursors and the rat adrenal 21-OH-ase, determining enzymatic constants for I and II (usual and unusual substrates, respectively). Homogenized adrenals from normal rats were incubated with various combinations of concentrations of I-7- 3 H and/or II- 14 C, acting as substrates and/or inhibitors of 21-OH-ase. The results showed that 21-OH-ase uses II almost as efficiently as I. The K_m values were about the same for both I and II (13.9 and 14.2×10^{-6} M/L), respectively, however, the V_{max} values were 54.6 and 26.0×10^{-7} M/L/min for I and II, respectively. The amounts of I required to saturate the 21-OH-ase was double that of II. Further kinetic studies showed that both I and II inhibit the 21-hydroxylation of the other in a reciprocal fashion. While II inhibits the 21-hydroxylation of I by competitive inhibition, I inhibits the 21-hydroxylation of II through a mixed type of inhibition. The results suggest that, rather than the existence of two different specific enzymes (one for I and another for II) as it has been postulated by others, it seems that we are dealing with a 21-hydroxylation system with two active sites. One site used only I and the other site uses I and/or II indistinctively.

INTRODUCTION

If one observes the spectrum of syndromes due to adrenal enzyme deficiencies in humans [1], probably the most frequent is the adrenogenital syndrome in which a deficiency occurs in the 21-hydroxylation of steroids (precursors or intermediates) involved in the biosynthesis of active corticosteroid hormones [1-3]. The lack of 21-hydroxylation results in an appreciable deficiency in cortisol production, associated with virilization due to androgen formation originated from accumulated 17 α -hydroxyprogesterone, and over excretion of pregnantriol [4].

This enzyme defect clinically shows two distinctive varieties of the syndrome, based on whether the

water-electrolyte homeostasis is either compensated (called also "non-salt losing variety") or not compensated (known as "salt losing variety") [1, 5-7].

The difference in the two varieties depends on either normal (some times hypersecretion of aldosterone) [5, 6] or defective aldosterone biosynthesis [1, 5, 6], respectively. In both instances, deficiency in cortisol production and virilization takes place [1].

Among others, two main propositions have been suggested to explain the different expressions of the 21-hydroxylation deficiency [1]:

(A) There are two different 21-hydroxylating systems, one specific for progesterone and concerned with aldosterone biosynthesis and the other specific for 17 α -hydroxyprogesterone (17-OH-P) involved in cortisol biosynthesis.

(B) There is a single enzymatic system responsible for the 21-hydroxylation which, when completely defective, interferes with both, cortisol and aldosterone biosynthesis [1] with the subsequent salt and water loss, however, when partially defective, it may affect only the cortisol biosynthesis without alteration in the aldosterone production, with the subsequent regulatory control of salt and water [4].

Following the general scheme of biosynthesis, as indicated in Fig 1, one can see that starting from progesterone, various hydroxylating systems participate in the adrenocortical steroid hormone biosynthesis. The microsomal 17 α -hydroxylase in the

List of Steroids: P = Progesterone = 4-Pregnene-3,20-dione; 17-OH-P = 17 α -hydroxyprogesterone = 17 α -hydroxy-4-Pregnene-3,20-dione; DOC = Cortexone = 21-hydroxy-4-Pregnene-3,20-dione; B_k = Corticosterone = 11 β ,21-dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione; Aldo = Aldosterone = 11 β ,21-dihydroxy-4-pregnene-18-al-3,20-dione; F_k = Cortisol = 11 β ,17 α ,21-trihydroxy-4-pregnene-3,20-dione; S_R = Substance's Reichstein S = Cortexolone = 17,21-dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione; 18-OH-DOC = 18-hydroxy-DOC = 18,21-dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione; E_k = Cortisone = 17,21-dihydroxy-4-pregnene-3,11,20-trione; A_k = Kendall's Compound A = 21-hydroxy-4-pregnene-3,11,20-trione.

List of Enzymes: 17 α -OH-ase = 17 α -hydroxylase; 21-OH-ase = 21-hydroxylase; 11 β -OH-ase = 11 β -hydroxylase.

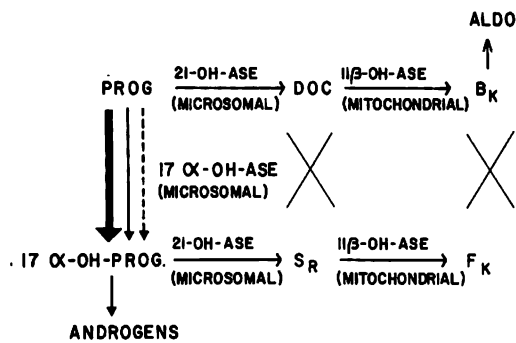


Fig. 1. Scheme of corticosteroid biosynthesis in various species exhibiting differences in the relative activity and concentration of 17 α -hydroxylase, as indicated by the intensity of the corresponding arrows.

Note: for abbreviations see list of steroids and enzymes.

adrenal gland converts progesterone to 17-OH-P. These two compounds are the precursors of the two distinctive pathways shown. While progesterone is the precursor of corticosterone and aldosterone, following the upper route, the portion of progesterone which is converted to 17-OH-P becomes precursor of cortisol, following the lower route. Both, progesterone and 17-OH-P are converted through 21-hydroxylation, also in the microsomal fraction, in cortexone (DOC) and corticolone (S_R or Substance Reichstein's S), respectively. Both steroids are, thereafter, transferred to mitochondria, where by the action of 11 β -hydroxylase are converted to corticosterone and cortisol, respectively [8a].

The 17 α -hydroxylase, whose relative activity and concentration varies in the adrenals of different species, determines the predominance of cortisol or corticosterone in the adrenal secretion [9–15].

The presence and high activity of 17 α -hydroxylase in the human adrenals, for example, is responsible for the significant transformation of progesterone to follow the lower route of biosynthesis and, therefore, the adrenal secretion exhibits a predominance of cortisol (F_k) over corticosterone (B_k). In contrast, as it has been generally accepted, due to lack of 17 α -hydroxylase in the rat adrenal, the conversion of progesterone to DOC and B_k , makes the latter, and not cortisol, the dominant corticoid secreted by the rat adrenal.

Recently, due to the high sensitivity and specificity in some of the methods now available, the presence of very small amounts of 17 α -hydroxylated steroids, such as cortisol, have been detected in the rat adrenal gland [16], although these compounds are not formed in detectable amounts by the incubation procedures generally used and reported.

Progesterone is the natural substrate of 21-hydroxylase in the rat adrenal, and therefore, when it is incubated with homogenized rat adrenals, because of the absence or perhaps the extremely low effectiveness of 17 α -hydroxylase [16, 17], it is not possible to detect formation of 17 α -hydroxylated steroids, with the consequent predominance in the formation of DOC, 18-OH-DOC and corticosterone [18].

Besides, it has been shown that cortexone is not converted to corticolone (8b) and that corticosterone is not converted to cortisol.

17-OH-P could be considered as a non natural substrate for the rat adrenal 21-hydroxylase, however, when it is exogenously added and incubated with rat adrenals, one expects the formation of corticolone, cortisol and cortisone.

Since in human adrenal both 17 α -hydroxylase and 21-hydroxylase are present in the microsomal fraction, and both effectively compete for the same substrate, progesterone, the results obtained from either "in vivo" or "in vitro" experiments, using this substrate in human adrenal tissue, could be difficult to interpret. In order to study and compare the 21-hydroxylation of progesterone and 17-OH-P, it was decided that the rat adrenal, whose main pattern does not include detectable 17 α -hydroxylase, could provide a suitable model to work with.

Using such a model, one anticipates that progesterone could be converted to DOC and B_k without conversion to 17 α -OH-steroids, while 17-OH-P used as exogenous substrate could be converted to S_R and F_k .

Since progesterone is a natural substrate, but 17-OH-P is not a common one for the rat adrenal 21-hydroxylase, our first question was to find out if 17-OH-P was converted in their corresponding 21-hydroxylated steroids by the rat adrenal homogenates and if so, in which degree this conversion occurred in comparison with that observed for progesterone, under identical experimental conditions. If both substrates were significantly transformed into their corresponding 21-hydroxylated steroids, the studies of possible interactions between both substrates (progesterone and 17-OH-P) and the probable competitive effect of each of them on the 21-hydroxylation of the other, were justified.

EXPERIMENTAL

Normal female rats of about 180 g were killed by decapitation and their adrenals removed immediately after, decapsulated and homogenized in a phosphate-buffer at pH 7.4, containing 30 mM Nicotinamide. The homogenate was prepared in such a way that 0.8 ml of it, contained one homogenized adrenal. Progesterone-[4-¹⁴C] and 17-OH-P-4-¹⁴C were used as substrates in parallel incubation in the preliminary comparative study at the concentrations indicated in Fig 2. However, when both steroids were incubated simultaneously as substrates, to study possible reciprocal interactions, a different isotope was used for each of the substrates: progesterone-[7-³H] and 17-OH-P-4-¹⁴C in the relative concentrations shown in Fig 3. In order to allow the various hydroxylases to act adequately, a NADPH regenerating system was prepared, consisting of NADP and glucose-6-phosphate in one solution and glucose-6-phosphate-dehydrogenase in a second solution. Their concen-

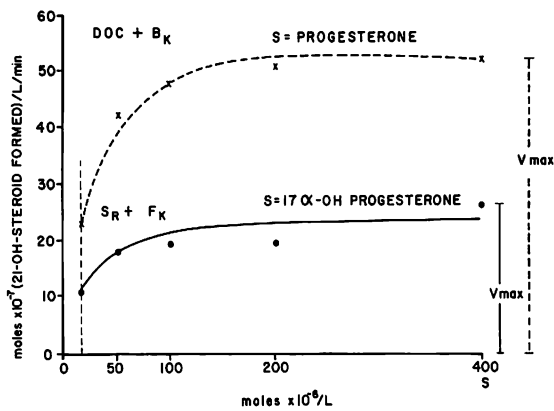


Fig. 2. Relative amounts of 21-hydroxylated steroids formed from either progesterone (x----x) or 17 α -OH-progesterone (—) when incubated as substrates in various concentrations in the presence of one homogenized rat adrenal.

trations were such, that when 0.1 ml of each of the two solutions were added to the media, the final concentrations of the components were 0.4 mM, 3 mM and 1.0 IU/ml of media, respectively. The incubations were carried out at 37°C, under atmosphere of air, during 10 min in a Dubnoff incubator.

At the end of the incubation period, 10 ml of 0.1N HCl were added and the radioactive steroids were extracted 5 \times with ether:CHCl₃ (4:1, v:v). The extracts contained from 95 to 100% of the initial radioactivity incubated. The extracts were analyzed by paper chromatography (18, 19, 20a) and the radioactive steroids formed were detected, eluted and aliquots counted, using a Liquid Scintillation Spectrophotometer Nuclear Chicago Corp., Mark I, applying the channel ratio technique for double isotope detec-

tion [21]. In some instances, acetylation (20b, 22) and rechromatography were required. The isolated steroids were finally identified by recrystallization in the presence of 20 mg of the authentic corresponding steroid, until constant specific activities were achieved.

Since several other enzymes are present in the incubation media, besides 21-hydroxylase, in order to determine the enzyme activity for each substrate, it was necessary to take into account all the 21-hydroxylated steroid formed from each of the two substrates. For this reason, they were isolated, identified and quantified individually. The 21-hydroxylating activity for progesterone, when it was used as substrate, was determined by adding the amounts expressed in nmol, of cortexone, corticosterone, Kendall's A and 18-OH-DOC formed. On the other hand, when 17-OH-P was the substrate, the sum of the amounts of cortexolone, cortisol and cortisone formed, expressed in nmol, was used to determine the 21-hydroxylase activity for 17-OH-P.

In the incubations in which 17-OH-P was used as substrate, a very small amount of radioactivity was detected, in some chromatograms, at 4-androstenedione position, however, since at least half of the initial substrate remained intact at the end of the incubation period, in all instances, the influence of 17-20 desmolase present in the media could not affect significantly the conversion rate of 17-OH-P to cortexolone and cortisol.

RESULTS

In the first comparative study, as shown in the abscissa in Fig 2, various concentrations of either progesterone-[4-¹⁴C] or 17-OH-P-4-¹⁴C were incubated in parallel tubes in the presence of one homogenized

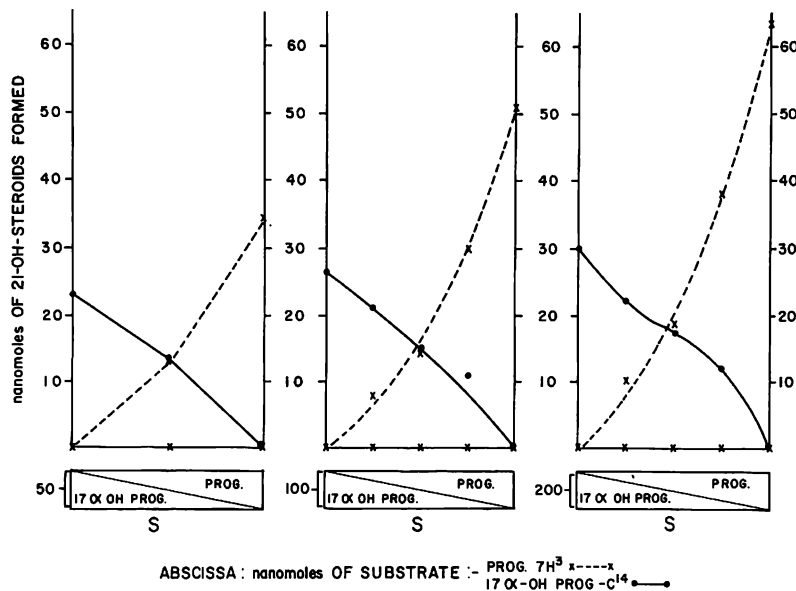


Fig. 3. Amounts of 21-hydroxysteroids formed from either progesterone-[7-³H] or 17 α -hydroxyprogesterone-[4-¹⁴C], when incubated simultaneously at various relative concentrations of each substrate, as indicated by the diagonal line dividing the rectangles shown under the abscissa axis in each graph, but keeping constant the total initial concentration of both substrates at 50, 100 and 200 nmol/ml adrenal in the left, center and right graphs, respectively.

adrenal obtained as an aliquote from the same pool of rat adrenals. One can see from the results that the maximum velocity or saturation level of the active sites of the 21-hydroxylating system seemed to be about double when progesterone was used as substrate (dotted line) than when 17-OH-P was used as substrate (solid line).

The results suggest that there are about twice as many active sites for progesterone than the active sites for 17-OH-P, in the rat adrenal 21-hydroxylase.

As indicated in Fig 3, when both substrates, progesterone-[7-³H] and 17-OH-P-4-¹⁴C were incubated simultaneously, varying their relative concentrations as it is indicated in the abscissa in the three graphs, but keeping constant the total mass of substrates, which was 50 nmol (in the left graph), 100 nmol (in the centre graph) or 200 nmol (in the right graph), it is possible to observe the curves obtained which represent the total 21-hydroxylated steroids formed from progesterone-[7-³H] (dotted line) as well as from 17-OH-P-4-¹⁴C (solid line).

The results show that both substrates were hydroxylated simultaneously in function to their initial relative content. However, by adding the total nmol of 21-hydroxylated steroids formed from the two substrates, there seems to be an indication of a reciprocal inhibitory effect of both steroids on the 21-hydroxylation of the other. Besides, since the points of intersection of both curves (dotted and solid lines), in the three graphs, coincide essentially with the ratio 1:1 for the two initial substrates, independently of the total concentration of the mixture, it suggests that the affinities of the two substrates for the 21-hydroxylating enzyme system are very similar.

Finally, it can be seen that for the three concentrations used, the maximum conversion of progesterone was always greater than that of 17-OH-P in the formation of 21-hydroxylated steroids. As the substrate concentration approaches and finally reaches the enzyme saturation (right graph), the maximum capacity of 21-hydroxylation of progesterone resulted to be about double that of 17-OH-P, as previously shown in Fig 2, when both substrates were incubated separately.

Since the 21-hydroxylation took place simultaneously for both substrates and, when both are present, a reciprocal inhibitory effect was suggested, further experiments were designed to determine the type of inhibition through which the progesterone and 17-OH-P could interact.

In these experiments, one of the two steroids was used as a radioactive substrate, varying its initial concentration (50, 100, 200 and 400 nmol/ml) and incubated in the absence, as well as in the presence of various concentrations (100, 200 and 400 nmol/ml) of the other steroid acting as a non-radioactive inhibitor.

The results obtained were analyzed by three graphic procedures, according to Hanes [23, 24], Woolf [23, 25] and Lineweaver-Burk [23, 26], in

order to determine the characteristics of the reciprocal inhibition observed.

When various concentrations of progesterone-[4-¹⁴C] (acting as substrate) were incubated in the presence of various concentrations of cold 17-OH-P (acting as inhibitor), the following results were obtained:

1. According to Hanes, the slope of the curves express the reciprocal of the maximum velocities. Since all the lines were parallel, the maximum velocity seems to remain constant in the absence as well as in the presence of various concentrations of 17-OH-P; however, the K_m value changes and the K_p values obtained from the intersection of the curves with the abscissa increase significantly as the concentration of inhibitor increases.

2. When the results were plotted according to Woolf, a significant difference was observed in the slopes of the curves, which became steeper as the concentration of inhibitor increases, indicating a significant change in the K_m value and the K_p values turn larger. At the same time, a tendency for all the curves to cross the ordinate axis at the same point was observed, suggesting a constancy in the maximum velocity values.

3. Finally, when the experimental results were plotted according to Lineweaver-Burk's method, it was possible to see that all the curves tend to cross the ordinate axis at the same point, indicating that the maximum velocity of the 21-hydroxylase remains essentially constant in the absence as well as in the presence of various concentrations of 17-OH-P. However, the K_m and K_p values, obtained at the intersection of the curves with the negative side of the abscissa, were significantly different and these values changed more as the concentration of 17-OH-P, acting as inhibitor, increases. Apparently, according with these results, the inhibitory effect of 17-OH-P on the 21-hydroxylation of progesterone is of the competitive type.

When the role of the two steroids was inverted or in other words, when 17-OH-P-4-¹⁴C was used as substrate, in concentrations of 50, 100, 200 and 400 nmol/ml and incubated in the absence, as well as in the presence of various concentrations of cold progesterone (100, 200 and 400 nmol/ml), acting as inhibitor, and the experimental results were plotted again, according to the three different graphical methods described, the following results were obtained:

1. According to Hanes' method, one could see a clear inhibitory effect. The curves were not parallel and they cut the abscissa axis at different points, which means that both, the Michaelis constant as well as the maximum velocities change simultaneously, as the concentration of progesterone, acting as inhibitor increases.

2. Plotting the results according to Woolf's method, one could observe that both, the slopes of the curves,

Table 1. Apparent K_m and V_{max} values obtained for rat adrenal 21-hydroxylase, calculated according to various graphical methods, indicating a reciprocal inhibitory interaction observed between progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone on their 21-hydroxylation, when one is used as radioactive substrate and the other as cold inhibitor

Substrate-[4- ¹⁴ C] = S Cold inhibitor = I	I nmol/ ml	K_m^* and K_p values (a) $\times 10^{-6}$ M/L				V_{max} values (a) $\times 10^{-7}$ M/L/min				Type of inhibition
		①	②	③	Ave.	①	②	③	Ave.	
S = Prog-[4- ¹⁴ C] I = 17 α -OH-Prog	0	12.5*	13.7*	14.2*	13.5*	54.2	54.6	54.9	54.6	Competitive
	100	116.2	124.0	131.0	123.7	50.2	50.8	52.5	51.2	
	200	303.9	256.2	227.2	262.4	59.6	52.9	48.3	53.6	
	400	393.4	—	305.9	349.7	47.6	—	40.6	44.1	
S = 17 α -OH-Prog-[4- ¹⁴ C] I = Progesterone	0	13.6*	14.9*	13.5*	14.0*	27.3	24.8	24.2	25.4	Mixed
	100	30.7	30.5	30.9	30.7	20.8	20.8	20.8	20.8	
	200	54.2	58.7	59.7	57.5	18.2	18.7	18.8	18.6	
	400	68.9	80.0	—	74.5	14.2	13.9	—	14.1	

(a) Individual values and averages for K_m , K_p and V_{max} .

① Hanes Method.

② Woolf Method.

③ Lineweaver-Burk Method.

as well as the intersection with the ordinate axis were different for each of the concentrations of progesterone, used as inhibitor, indicating once more that both the K_m values as well as the maximum velocities change as progesterone concentration increases.

3. Finally, when the results were plotted according to Lineweaver-Burk, it was observed that although the point of intersection of the curves is closer to the ordinate than to the abscissa axis, there is a significant difference in the values for V_{max} as well as a significant difference in the K_m values, as the concentration of inhibitor increases.

These last results are suggesting that progesterone inhibits the 21-hydroxylation of 17-OH-P through a mixed type of inhibition, according to Dixon [23]. In other words, progesterone inhibits the 21-hydroxylation of 17-OH-P partly by competition, but at the same time, there seems to be a secondary inhibitory effect of non competitive type. The actual apparent K_m and/or K_p values as well as the corresponding V_{max} values calculated for each of the three graphic methods described, including the corresponding average values, with respect to the concentration of the steroid acting as inhibitor, in both experimental designs used, are summarized in Table 1.

The upper part of this table, in which radioactive progesterone was used as substrate and cold 17-OH-P as inhibitor, shows a relative constancy in the V_{max} values with a very clear and significant change in the K_m values, as the concentration of the 17-OH-P (inhibitor) increases. In contrast, the lower part of the table, shows that when radioactive 17-OH-P was used as substrate and cold progesterone acted as inhibitor; a progressive change takes place for both K_m and V_{max} values as the concentration of progesterone (inhibitor) increases. The results indicate that 17-OH-P inhibits the 21-hydroxylation of progesterone through a competitive type of inhibition, while the 21-hydroxylation of 17-OH-P seems to be inhibited by progesterone through a mixed type of inhibition.

DISCUSSION

When one considers the hypothesis suggesting the existence of two different 21-hydroxylases, one specific for progesterone and the other specific for 17-OH-P [1, 27] and according with the results obtained in the present study, namely the reciprocal inhibitory effect observed for both substrates on the 21-hydroxylation of the other, there seems to be an indication that such a high specificity for the two different substrates may not be entirely true. Actually, the experimental results obtained, in the present study, are more in favour of supporting the suggestion of the existence of a 21-hydroxylating system that has the peculiar characteristic of having two different active sites (A and B) with distinct properties. Therefore, the following hypothesis is proposed.

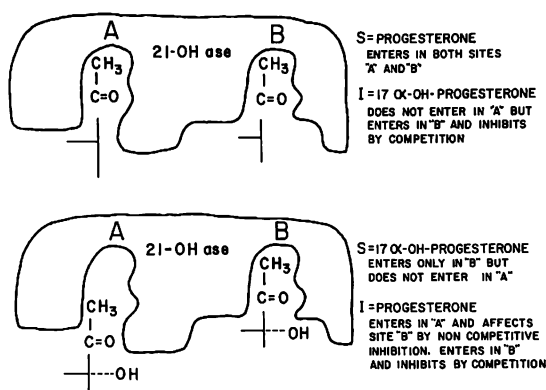


Fig. 4. Scheme showing the alternative possibilities of having one 21-hydroxylating enzyme system exhibiting two different active sites: Site A, which hydroxylates progesterone but, probably for steric impediment does not accept 17 α -hydroxyprogesterone as substrate and Site B, which hydroxylates both progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone indistinctly. The various alternative possibilities for progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone, acting either as Substrate (S) or Inhibitor (I) are briefly described in the right side of the figure.

The 21-hydroxylating system, at least in the total homogenized rat adrenal, might be represented by one single enzyme with two active sites, as illustrated in Fig 4. Both, sites A and B, accept progesterone as substrate but only one of them (site B) accepts 17-OH-P as substrate. In other words, 17-OH-P, probably due to steric impediment, is unable to enter in the site A, and it uses only progesterone as substrate. In contrast, site B used both, progesterone and 17-OH-P, indistinctively.

When 17-OH-P is present as inhibitor and incubated together with progesterone used as substrate, the inhibitor does not affect site A, but enters in site B and competes with the substrate progesterone. Therefore, 17-OH-P acts as a competitive inhibitor in the 21-hydroxylation of progesterone, through site B.

On the one hand, when progesterone is present as inhibitor and it is incubated together with 17-OH-P, acting as substrate, there is a competition between progesterone and 17-OH-P for site B, since both steroids use it, indistinctively. On the other hand, simultaneously, the inhibitor progesterone enters, bounds and uses site A, requiring cofactors and probably, causing changes in the entire enzyme, which may affect the 21-hydroxylating efficiency of site B, creating a secondary effect of non competitive type, modifying the effectiveness of 21-hydroxylation of 17-OH-P by site B.

This is perhaps the reason why progesterone seems to inhibit the 21-hydroxylation of 17-OH-P through a mixed type of inhibition, partially through competitive and partially through non competitive type of inhibition.

Since the preparation used in the present study consisted of total homogenates obtained from decapsulated rat adrenals, it is important to consider the possibility that the 21-hydroxylating system present in the various adrenal zones (fasciculata, reticularis and glomerulosa) could exhibit differences regarding the characteristics of the active sites described. This remains to be elucidated.

If the results reported now for rat adrenal 21-hydroxylase occurs also in other species, namely in human adrenals, it still has to be proven. However, if one assumes that human adrenal 21-hydroxylating system could exhibit similar characteristics to those observed in the rat adrenals, it might be acceptable to speculate and discuss the present knowledge regarding the alternative explanations for the various types of adrenogenital syndromes due to lack of 21-hydroxylase in humans.

The present paper actually deals with a model which can be applied to other species, including human adrenals. Further studies and experiments to be carried out, will be aware of the peculiar property described here for the rat adrenal 21-hydroxylase.

Let us consider first, the hypothesis suggesting the existence of two different enzymes: one 21-OH-ase-A, specific for progesterone and the other 21-OH-ase-B, specific for 17-OH-P, particularly supported by the

studies of Sharma and Dorfman [27] with further support given by the finding of high aldosterone production in the compensated form [6] and the differences in the ability to produce cortisol and aldosterone under ACTH administration and salt deprivation [5]. In this situation, various alternative possibilities could occur:

(a) The defect in both enzymes A and B would result in a simultaneous deficiency of aldosterone and cortisol.

(b) If only the 21-OH-ase-B is deficient while the 21-OH-ase-A remains intact, normal aldosterone would be expected to be associated with deficiency in cortisol biosynthesis.

These two situations would explain the two different varieties of the adrenogenital syndromes described, due to 21-hydroxylase deficiencies, the "salt losing" and the "non-salt losing" syndromes, respectively.

(c) There is another possibility that could correspond to the deficiency in the 21-OH-ase-A without alteration of the 21-OH-ase-B, in which case it could result in deficient aldosterone production with normal levels of cortisol. This means, a "salt losing" syndrome without virilization, a situation which has not been so far reported due to a 21-hydroxylation deficiency, but it has been considered that it can occur and actually it has been attributed to 18-hydroxylase deficiency [1].

The deficiency of either of the two enzymes, 21-OH-ase-A or 21-OH-ase-B could occur, as it has been mentioned above. The deficiency of 21-OH-ase-A has not been clearly and specifically described, while the deficiency of 21-OH-ase-B would correspond to the "non-salt losing" syndrome. However, it is very unlikely and highly improbable to consider a simultaneous deficiency in the two different enzymes in the same individual, in order to explain the "salt losing" variety, mainly if one takes into account that the frequency of this variety is so high [1]. This makes it difficult to accept the possibility of considering two different 21-OH-ases, each of them specific for each of the two substrates, progesterone and 17-OH-P.

Now let us consider the hypothesis proposing one single enzyme, postulated by Bongiovanni and Eberlein [1, 4], who found lower levels of urinary cortisol metabolites in the "salt losing" variety than in the compensated form, suggesting that there are different degrees of enzyme deficiency. If one takes into consideration the peculiar characteristics for the two distinct active sites supported in the present paper, and if the possibility is acceptable that a similar situation could occur in human adrenals, one could easily explain the two clinical varieties of the adrenogenital syndrome due to 21-hydroxylase deficiency in humans.

If the enzyme defect is limited and it alters only

site B, leaving intact site A (see Fig 4), cortisol production will not occur while aldosterone biosynthesis continues through site A, leading to the "non-salt losing" variety described. However, if the enzyme defect is more extensive, it could alter both sites A and B with the subsequent lack of both, cortisol and aldosterone production, as it occurs in the "salt losing" variety of the syndrome.

Moreover, if there is a defect in the enzyme, which could alter only site A, leaving intact site B, both aldosterone and cortisol could be biosynthesized and produced normally, and the genetic defect might be masked in such a way that it could be difficult to detect, at least, with the present methodology available. Actually, the individuals with a defective site A, the latter case, can be easily considered as normal individuals.

REFERENCES

- Bongiovanni A. M.: In *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, 3rd. Edn. (Edited by J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden and D. S. Fredrickson). McGraw-Hill, New York (1972) pp. 857-885.
- Bongiovanni A. M. and Eder W.: *J. clin. Invest.* **37** (1958) 1342-1347.
- Bongiovanni A. M. and Eberlein W. R.: *Metab. Clin. Expl.* **10** (1961) 917-935.
- Bongiovanni A. M. and Eberlein W. R.: *Pediatrics* **21** (1958) 661-672.
- Degenhart H. J., Visser H. K. A., Wilmink R. and Crougths W.: *Acta endocr. Copenh.* **48** (1965) 587-601.
- Bartter F. C., Henkin R. I. and Bryan G. T.: *J. clin. Invest.* **47** (1968) 1742-1752.
- Rosenbloom A. L. and Smith D. W.: *Pediatrics* **38** (1966) 215-219.
- Dorfman R. I. and Ungar F.: *Metabolism of Steroid Hormones*. Academic Press, New York (1965) pp. 123-213; pp. 203 and 384.
- Bush I. E.: *J. Endocr.* **9** (1953) 95-100.
- Romanoff E. B., Hudson P. and Pincus G.: *J. clin. Endocr. Metab.* **13** (1953) 1546-1547.
- Sweat M.: *J. clin. Endocr. Metab.* **15** (1955) 1043-1056.
- Hudson P. B. and Lombardo M. E.: *J. clin. Endocr. Metab.* **15** (1955) 324-330.
- Grant J. K., Forrest A. P. M. and Symington T.: *Acta endocr. Copenh.* **26** (1957) 195-203.
- Tarrell G. L.: *Fedn. Proc.* **12** (1953) 41.
- Zaffaroni A. and Burton R. B.: *Archs biochem. Biophys.* **42** (1953) 1-6.
- Herrera J., León C., Morán L., Raudales L. and Bermúdez J. A.: *J. steroid Biochem.* **5** (1974) 312.
- Hofmann F. G.: *Endocrinology* **60** (1957) 382-389.
- Domínguez O. V.: *Steroids* suppl. II (1965) 29-49.
- Burton R. B., Zaffaroni A. and Keutmann E. H.: *J. biol. Chem.* **188** (1951) 763-771.
- Domínguez O. V.: In *Methods for Steroid Analysis*, 1st Edition (Edited by H. Carstensen). Marcel Dekker, New York (1968) pp. 210-241; pp. 222-226.
- Bush E. Y.: *Analyt. Chem.* **35** (1963) 1024-1029.
- Domínguez O. V., Seely R. J. and Gorski J.: *Analyt. Chem.* **35** (1963) 1243-1247.
- Dixon M. and Webb E. C.: *Enzymes* 2nd Edn. Academic Press, New York (1965) p. 326.
- Hanes C. S.: *Biochem. J.* **26** (1932) 1406-1421.
- Wolf B.: In *Allgemeine Chemie der Enzyme* (Edited by J. B. S. Haldane and K. G. Stern), Dresden and Leipzig, Steinkopff Verlag (1932) p. 119.
- Lineweaver H. and Burk D.: *J. Am. chem. Soc.* **56** (1934) 658-666.
- Sharma D. C. and Dorfman R. I.: *Fedn. Proc.* **22** (1963) 530.

INTRODUCCION

La 17 α y la 21-hidroxilación de esteroides en la adrenal tienen una gran importancia, ya que constituyen etapas esenciales en la biosíntesis de hormonas corticosteroides.

Los sistemas enzimáticos que en la adrenal son responsables de la 21-esteroide hidroxilación (1,2,3) y de la 17 α -esteroide hidroxilación (1,2,3), han sido ampliamente estudiados y la actividad de ambas hidroxilasas ha sido localizada en la subfracción microsomal del retículo endoplásmico liso (4,7). Ambas enzimas requieren NADPH (5) como cofactor y la presencia de oxígeno molecular (6). Su pH óptimo es 6.5 -7.0 (8) y se ha establecido la estequiometría para ambos sistemas, midiendo el producto formado, el consumo de oxígeno y la oxidación de NADPH, habiéndose encontrado una relación de 1:1:1 (9).

En intentos por lograr la purificación de estos sistemas, se ha logrado la solubilización del sistema de 21-hidroxilación con Triton X-100 (10), sin embargo, se ha logrado tan solo una purificación parcial de la 17 α -hidroxilasa de microsoma de adrenal y de testículo (11). Ninguna de estas enzimas se ha obtenido en forma pura y cristalina.

La glándula suprarrenal de rata, en condiciones normales, no manifiesta actividad detectable de 17 α -hidroxilasa (12,13), pero en preparaciones de adrenal de ratas hipertensas se han aislado esteroides 17 α -hidroxilados. Young y Sweat (14), reportan que la actividad de esta enzima no se manifiesta debido a una inhibición causada por el sistema 11 β -hidroxilante, ya que eliminando uno de los componentes de ese sistema, se manifiesta la actividad de 17 α -hidroxilasa. Por otra parte, aplicando técnicas de detección mas sensibles y específicas como lo son las técnicas de radioinmunoanálisis, disponibles en la actualidad, la detección de esteroides 17 α -hidroxilados ha sido posible, aunque estos productos están presentes en adrenales de ratas normales en cantidades extremadamente pequeñas (15).

La 17 α -hidroxilación es un paso determinante en la biosíntesis de corticosteroides, ya que de la concentración y actividad de la 17 α -hidroxilasa depende la cantidad relativa de cortisol o corticosterona que se sintetizan. Dependiendo de la actividad y concentración de la 17 α -hidroxilasa se han reportado diferentes relaciones de cortisol/corticosterona producida y secretada en diversas especies de mamíferos.

En el hombre predomina notablemente el cortisol sobre la corticosterona, en tanto que en la rata, ante la esencialmente nula presencia de 17α -hidroxilación, predomina la secreción de corticosterona sobre la de cortisol.

En el humano, al hidroxilarse la progesterona en C_{21} y en C_{11} , se produce corticosterona y posteriormente por acción de la 18-hidroxilasa y una 18-deshidrogenasa, se sintetiza la aldosterona.

Si la progesterona se hidroxila inicialmente en C_{17} para formarse 17α -OH-progesterona, al ser ésta el sustrato de la 21-hidroxilasa, la biosíntesis sigue un camino diferente hacia la formación de cortexolona, la que hidroxilada en C_{11} da lugar a cortisol.

Al existir una hidroxilación deficiente en el carbono 21 (16, 17, 18) resulta como consecuencia una disminución en la síntesis de cortisol y consecuentemente, un aumento en la secreción de corticotropina hipofisiaria, la que estimula así la esteroidogénesis, que estando a su vez anormalmente impedida por la deficiencia en 21-hidroxilasa, da lugar a una hiperplasia de la glándula.

Eberlein y Bongiovanni (19) sostienen que en la hiperplasia suprarrenal congénita, por defecto de la 21-hidroxilación, puede presentar dos variedades distintas del mismo trastorno, las cuales dependen de la intensidad y naturaleza de la alteración genética causante.

Ha sido sugerida la posibilidad de que la hidroxilación en el carbono 21 esté catalizada por dos enzimas diferentes y altamente específicas: una de ellas, la 21-hidroxilasa(a), que actúa exclusivamente sobre la progesterona (involucrando la producción de cortexona, corticosterona y aldosterona), en tanto que la 21-hidroxilasa(b), solo utiliza la 17 α -OH-progesterona como sustrato (participando en la biosíntesis de cortexolona y cortisol). La deficiencia de las dos enzimas (21-hidroxilasas a y b), simultáneamente, caracterizaría el llamado síndrome adrenogenital congénito con pérdida de sal, en el cual hay imposibilidad de biosintetizar tanto la aldosterona como el cortisol. El consecuente, acúmulo anormal de 17 α -OH-progesterona, hace posible que las vías metabólicas se desvíen hacia la biosíntesis de andrógenos en la adrenal y consecuentemente, manifestándose virilización.

Por otra parte, si hay deficiencia solo de la 21-hidroxilasa (b) conservando íntegra la 21-hidroxilasa(a), la progesterona podría ser hidroxilada en el carbono 21 por acción de la 21-hidroxilasa(a), manteniéndose normal la producción de aldosterona, pero la falla en la 21-hidroxilasa(b), impediría la conversión de 17α -OH-progesterona en cortexolona, siendo nula la biosíntesis de cortisol. En este caso, el acúmulo de 17α -hidroxiprogesterona favorecería su conversión a andrógenos, dando así lugar al denominado síndrome de virilización simple, caracterizado por masculinización sin pérdida de sal, ya que la aldosterona continúa produciéndose normalmente.

En la adrenal de rata, al no estar expresada la 17α -hidroxilasa en cantidades detectables, la progesterona resulta ser el único sustrato natural de la 21-hidroxilasa. La 17α -OH-progesterona, al ser añadida al medio de incubación, resulta ser un sustrato no natural de esta enzima.

El propósito del presente trabajo, basado en el hecho de que experimentos preliminares demostraron que tanto la progesterona como la 17α -OH-progesterona resultaron ser eficientemente hidroxilados por la 21-hidroxilasa de adrenal de rata, es el estudiar en este modelo particular y en forma compara-

tiva, las características enzimáticas de la 21-hidroxilasa de adrenal de rata para los dos sustratos, así como las posibles interacciones que pudieran existir entre los sustratos cuando ambos están presentes simultáneamente y a disposición de la enzima.

De acuerdo con los resultados experimentales obtenidos, las conclusiones principales son las siguientes:

1.- Los valores de K_m para la 21-hidroxilasa para ambos sustratos (progesterona y 17α -hidroxiprogesterona) son muy similares, sin embargo, los valores de V_{max} , determinados en igualdad de condiciones, resultaron notablemente diferentes para los dos sustratos, siendo aproximadamente el doble para progesterona que para 17α -hidroxiprogesterona. Esto indica que el número de sitios activos que utilizan 17α -hidroxiprogesterona como sustrato de la 21-hidroxilasa, son aproximadamente la mitad del número de sitios activos que aceptan a la progesterona como sustrato.

2.- Empleando uno de los dos esteroides como sustrato y el otro como inhibidor, invirtiendo este papel a experimentos paralelos y repetidos, se observó que la 21-hidroxilación de cada uno de ellos, es inhibida en forma recíproca por el otro.

Así, la 17α -hidroxiprogesterona inhibe de manera competitiva la 21-hidroxilación de progesterona, en tanto que la progesterona inhibe la 21-hidroxilación de la 17α -hidroxiprogesterona mediante un mecanismo de tipo mixto.

3.- Los resultados mismos permiten proponer una hipótesis en la que se sugiere la existencia de un sistema 21-hidroxilante que presenta la característica peculiar de poseer dos sitios activos diferentes A y B. Ambos sitios aceptan la progesterona como sustrato, pero solo uno de ellos y no el otro, acepta también la 17α -hidroxiprogesterona como sustrato. En otras palabras, en tanto que el sitio activo B, 21-hidroxila indistintamente progesterona y 17α -hidroxiprogesterona, el sitio activo A solo acepta hidroxilar a la progesterona y no manifiesta afinidad por la 17α -hidroxiprogesterona.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Hechter, O. and Pincus, G.- *Physiol. Rev.* 34, 459 (1954).
- 2.- Plager, J.E. and Samuels, L.T.- *Arch. Biochem. and Biophys.* 42, 477 (1953).
- 3.- Hayano, M. and Dorfman, R.I.- *Arch. Biochem. and Biophys.* 36, 237 (1952).
- 4.- Plager, J.E. and Samuels, L.T.- *J. Biol. Chem.* 211, 21 (1954).
- 5.- Ryan, K.J., Engel, L.L.- *J. Am. Chem. Soc.* 78, 2654 (1956).
- 6.- Cooper, D.Y., Estabrook, R.W. and Rosenthal, O.- *J. Biol. Chem.* 238, 1320 (1963).
- 7.- Ryan, K.J. and Engel, L.L.- *J. Biol. Chem.* 225, 103 (1957).
- 8.- Harkins, J., Nelson, E.B., Masters, B.S. and Bryan, G.T.- *Endocrinology* 94, 3 (1974).
- 9.- Cooper, D.Y., Estabrook, R.W. and Rosenthal, O.- *J. Biol. Chem.* 238, 4 (1963).
- 10.- Manasimhulu, S., Cooper, D.Y. and Rosenthal, O.- 139th National Meeting of the American Chemical Society 1961, Abstract 153.
- 11.- Lynn, W.S., Brown, R.H.- *J. Biol. Chem.* 232, 1015 (1958).
- 12.- Hofmann, T.G.- *Biochem. Biophys. Acta* 58, 343 (1962).
- 13.- Brownell, K.A., Less, S.L., Bech, R.R. and Besch, P.K.- *Endocrinology* 72, 167 (1963).
- 14.- Young, R.B. and Sweat, M.L.- *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 579 (1967).
- 15.- Herrera, M.J.- Tesis profesional, U.N.A.M. (1973).

- 16.- Eberlein, W.R. and Bongiovanni, A.M.- J. Clin. Invest. 34, 1337 (1955).
- 17.- Jailer, J.W., Louchart, J., Cahill, G.F.- J. Clin. Invest. 31, 880 (1952).
- 18.- Bryan, G.T., Kliman, B., Bartter, F.C.- J. Clin. Invest. 44, 957 (1965).
- 19.- Eberlein, W.R., Bongiovanni, A.M.- Pediatrics 21, 661 (1958).



QUIMICA
D. E. P. G.