

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD - DCBS

ANALISIS CINETICO DEL PAPEL QUE EL β -HIDROXI-
BUTIRATO, EL FOSFATO Y LA NIGERICINA TIENEN
EN EL RECAMBIO DE CALCIO MITOCONDRIAL .

074824

TESIS QUE PRESENTA:

LIGIA GUADALUPE | TORO CALZADA,

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO
EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

AREA DE CONCENTRACION:
BIOQUIMICA

MEXICO D.F.
1980

074824

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN LOS LABORATORIOS DE
BIOQUIMICA Y BIOFISICA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
DE LA SALUD, UAM-I, BAJO LA DIRECCION DE:

DR. SERGIO ESTRADA-O.
DPTO. C. SALUD, UAM-I

TUTOR

DR. ARMANDO GOMEZ PUYOU
DPTO. BIOQUIMICA, CINVESTAV

ASESOR

DR. ANTONIO PEÑA
CENTRO INV. FISIOL. CEL., UNAM

ASESOR

M. EN C. MIREYA TORO-C.
DPTO. C. SALUD, UAM-I

INDICE

	PÁG.
INTRODUCCION	1
I. LA MEMBRANA	2
II. TRANSPORTE DE IONES EN LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL	5
III. TRANSPORTE DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL	9
A. PRIMERAS EVIDENCIAS	9
B. PROPIEDADES DEL SISTEMA DE TRANSPORTE	13
C. MECANISMO MOLECULAR	16
1. Transporte Electroforético	16
a. Estequiometría de carga +2. Uniport $+Ca^{2+}$	16
b. Estequiometría de carga +1	18
i. Simport $2Ca^{2+}/HPO_4^-$	19
ii. Simport $Ca^{2+}/monocarboxilato^-$	21
iii. Antiport Ca^{2+}/H^+	22
2. Transporte Electroneutro	23
a. Simport $Ca^{2+}/2A^-$	23
b. Antiport $Ca^{2+}/2H^+$	24
3. Transporte de Ca^{2+} y Pi. Vias separadas	24

	PÁG.
4. Reciclaje de Ca^{2+}	25
a. Regulación del Eflujo	26
b. Mecanismos de Translocación	28
c. Varios Acarreadores o un Canal Asimétrico, ...	29
 M A T E R I A L E S	 30
I. REACTIVOS QUIMICOS	30
II. APARATOS	30
 M E T O D O S	 31
I. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS.....	31
II. DEPLECION DE P_i ENDOGENO.....	32
III. DETERMINACION DE PROTEINA	32
IV. DETERMINACION DE ESPECTROS DIFERENCIALES	33
V. DETERMINACION DE LA CINETICA DE PEQUEÑOS CAMBIOS DE ABSORBENCIA	36
VI. MEDICION DEL TRANSPORTE DE Ca^{2+}	40
A. SELECCION DEL INDICADOR	42
B. SELECCION DE LAS LONGITUDES DE ONDA ADECUADAS,	44
1. Muréxido vs Muréxido + Ca^{2+}	44
2. Muréxido vs Muréxido + Mg^{2+}	46

	PÁG.
VII. CONDICIONES QUE SE MANTUVIERON CONSTANTES EN TODOS LOS EXPERIMENTOS	47
VIII. CALCULOS	47
 R E S U L T A D O S	 49
I. LA CINETICA DEL PROCESO	49
II. LA ESPECIFICIDAD DEL SUSTRATO	52
III. LA ESPECIFICIDAD ANIONICA	58
IV. EFECTO DE LA N-ETILMALEIMIDA	61
V. EFECTO DEL β - HIDROXIBUTIRATO COMO ANION	63
VI. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NIGERICINA	67
 D I S C U S I O N	 70
I. EL CALCIO RECICLA A TRAVES DE LA MEMBRANA. EL $\Delta\Psi$ REGU- LA SU INFLUJO Y EL ΔpH EL EFLUJO	70
II. LA β -HIDROXIBUTIRATO DESHIDROGENASA ESTA INTIMAMENTE RELACIONADA CON EL EFLUJO DE Ca^{2+} GENERADO POR LA OXI- DACION DEL β -HIDROXIBUTIRATO EN PRESENCIA EXCLUSIVA DE FOSFATO	72
III. LA OXIDACION DEL β -HIDROXIBUTIRATO ES LA QUE FAVORECE LA SALIDA DE Ca^{2+} DE LA MITOCONDRIA AL CITOSOL	73
IV. EN EL PROCESO DE RECAMBIO DE CALCIO, LAS FASES DE IN- FLUJO Y EFLUJO ESTAN REGULADAS DE DISTINTA MANERA	74
V. DIAGRAMA PROPUESTO PARA EXPLICAR EL CONTROL DEL RECAMBIO	

	PÁG.
DE CALCIO EN LA MEMBRANA MITOCONDRIAL	76
A. FASE DE INFLUJO	78
B. FASE DE EFLUJO	78
VI. PAPEL DEL ANTIPORT C^+/H^+ EN EL TRANSPORTE DE CALCIO...	79
VII. FUNCION BIOLOGICA DEL RECAMBIO DE Ca^{2+} A NIVEL CELULAR	80
CONCLUSIONES	83
BIBLIOGRAFIA	85

I N T R O D U C C I O N

La elucidación del mecanismo por el cual el ión calcio pudiera reciclar a través de la membrana mitocondrial, es de primordial importancia para comprender el papel regulatorio que ejerce este catión divalente sobre procesos biológicos fundamentales. Hasta la fecha, se han sugerido varios modelos mecánicos para explicar este fenómeno, siendo éstos tema de debate. Entre las observaciones publicadas al respecto, se ha señalado una asociación compulsiva existente entre los procesos de acumulación de Ca^{2+} y fosfato en mitocondrias con β -hidroxibutirato, puesta en evidencia por el ionóforo para K^+ , nigericina (1). Las mencionadas observaciones hasta la fecha no han podido ser explicadas, en cuanto al mecanismo subyacente que las determina. Con base en dichos resultados y con el fin de encontrarles una explicación a lo que posiblemente pudiese constituirse en un proceso regulatorio primario del transporte de calcio, se proyectó el presente trabajo.

A través de un estudio cinético apropiado, la presente tesis trata de establecer condiciones adecuadas para el análisis de la participación de los componentes del potencial proton-motriz, sobre el proceso de reciclaje de calcio en la membrana mitocondrial. Por otra parte, se intenta determinar la especificidad del proceso, con respecto a la coparticipación de sustratos oxidables y aniones en el mismo, lo que podría dar un idicio de la existencia de algún sistema estructural de transporte específico.

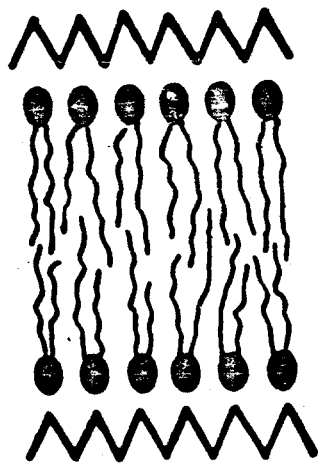
co de calcio o bien de la asociación de varios sistemas en paralelo. Asimismo, la búsqueda de un control bioquímico específico del reciclaje de calcio plantea la alternativa de establecer la naturaleza del proceso. Del mismo modo, el analizar experimentalmente la acción del β -hidroxibutirato como sustrato o como anión, podría ayudar a establecer si durante el proceso se requiere de la oxidación del ácido carboxílico y si está involucrada con especificidad la deshidrogenasa membranal correspondiente, en el control del transporte del catión divalente.

Finalmente y, dado que un ionóforo de selectividad primaria para K^+ y H^+ , es el responsable de generar cambios directos en la translocación membranal de Ca^{2+} (1), se intenta establecer la posible relación existente entre el transporte de iones divalentes con el de monovalentes y protones en la mitocondria.

A continuación se presenta un resumen de la información existente, conducente a resolver el problema planteado.

I. LA MEMBRANA.

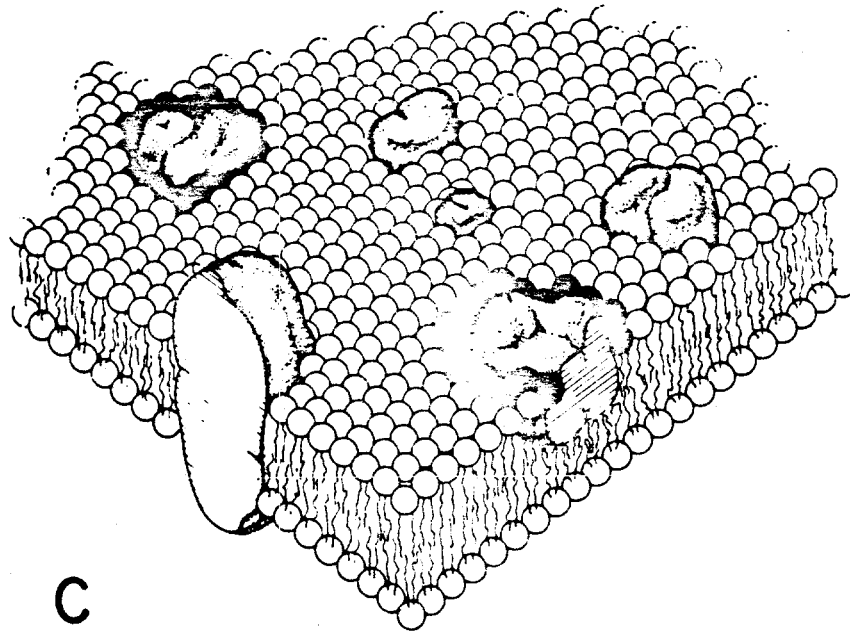
La membrana biológica requiere para su estructura y función de múltiples interacciones del tipo proteína-lípido (2). Los conceptos de organización de ella se han venido modificando desde que Davson y Danielli (3) propusieron el primer modelo en el que se postulaba que la membrana consistía de una monocapa de polipéptido que cubría ambos lados de una bicapa lipídica, *Fíg. 1 A*. Más tarde, Benson (4) sugirió que las cadenas polipeptídicas y las mo-



A



B



C

FIG. 1 MODELOS DE MEMBRANA.

A. Modelo de Davson y Danielli.

B. Modelo de Benson.

C. Modelo de Singer y Nicolson.

léculas de lípidos se hallaban intercaladas y organizadas en subunidades estructurales repetitivas, *Fíg. 1 B*. Este modelo condujo a una discusión considerable (5) acerca de las interacciones lípido-proteína particularmente en términos de efectos alostéricos y cooperativos. Además, también resultó incongruente con toda la evidencia experimental que muestra que el grueso del lípido membranal está organizado en una bicapa (6,7).

Actualmente, se considera a la membrana biológica estructurada en forma de un mosaico fluído, modelo postulado por Singer (8,9), en el que las proteínas globulares se encuentran intercaladas en la bicapa lipídica en forma de islas, icebergs o estructuras móviles *Fíg. 1 C*. Este modelo ha sido apoyado experimentalmente en estudios en los que se demuestra la existencia de interacciones lípido-proteína de tipo cooperativo, ya sean específicas (10), que son fundamentales para la función típica de la proteína, la cual depende de las características fisicoquímicas de su medio ambiente lipídico (11), o bien no específicas (12). También se ha demostrado la distribución asimétrica de los lípidos, mediante el uso de fosfolipasas, reactivos químicos específicos y microscopía electrónica de criofractura (13,14).

Por otra parte, investigaciones llevadas a cabo en membranas artificiales formadas exclusivamente de lípidos (15), demostraron que la impermeabilidad a iones de la membrana estaba determinada por la existencia de la bicapa lipídica, sin embargo, se sabía que en la membrana celular el flujo de iones ocurría con

una velocidad de varios órdenes de magnitud mayor que la predicha (16); este hecho quedó aclarado cuando al incorporar proteínas translocadoras de iones a membranas modelo, se observó que efectivamente existía un flujo a través de éstas (17).

Una de las membranas biológicas más complejas es la membrana interna mitocondrial, ya que contiene a gran número de enzimas y sistemas de transporte. La mitocondria presenta dos membranas: la membrana interna que forma invaginaciones en la matriz para formar las crestas (18,19), que es la barrera de permeabilidad y la membrana externa que parece actuar como barrera física a solutos relativamente grandes (20). Los dos sistemas membranales difieren significativamente en su composición química y propiedades físicas: la membrana externa contiene 50% de proteína y 50% de lípido, mientras que la interna tiene un 80% de proteína y sólo un 20% de lípido (20), siendo esta última el sitio donde se encuentran los sistemas de transporte de electrones y transducción energética (21). La membrana interna es asimétrica química y funcionalmente (22,23), teniendo además una organización vectorial específica (24), es intrínsecamente impermeable a H^+ , OH^- , Cl^- , a algunos aniones y cationes (25-27), pero posee una permeabilidad altamente selectiva para iones y metabolitos gracias a la presencia de sistemas de transporte específicos (28).

II. TRANSPORTE DE IONES EN LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL.

Los sistemas de transporte membranales de la mitocondria están funcionalmente integrados en su actividad y en su mayoría

presentan relaciones estequiométricas. Muchos de ellos ya han sido definidos (21,28,29), y aunque el desarrollo de principios mecanísticos no se ha concluído se ha constatado que estos obedecen a los postulados básicos de la hipótesis quimiosmótica de la fosforilación oxidativa (30,31). Los principios generales de esta hipótesis, se pueden resumir en cuatro postulados:

1. La ATPsintetasa es una ATPasa reversible, localizada en membrana, que posee una estequiometría $\rightarrow nH^+ / P$ característica y cuyo funcionamiento es protón-motriz.
2. La cadena respiratoria es un sistema protón-motriz quimiosmótico localizado en membrana, con una estequiometría $\rightarrow nH^+ / 2e^-$ específica. La polaridad debida a la translocación de protones al exterior de la membrana, es igual para la actividad redox normal de la cadena respiratoria que para la ATPasa cuando hidroliza ATP, es decir, positiva en el exterior y negativa en el interior.
3. Existen sistemas de translocación de solutos asociados a H^+ que permiten una estabilización osmótica y el transporte de metabolitos.
4. Ambos sistemas se encuentran embebidos en una membrana topológicamente cerrada y aislante, llamada membrana acoplante, la cual posee una fase no acuosa que sirve de barrera osmótica, de baja permeabilidad a solutos, en particular a H^+ y a OH^- .

De acuerdo a esta hipótesis, cualquier reacción oxidoreductora protón-motriz generará una diferencia de potencial protónico Δp a través de la membrana, el cual está dado por la suma de la diferencia del potencial eléctrico generado $\Delta \psi$ y la diferencia

del potencial termodinámico $-Z\Delta\text{pH}$, donde Z es el factor convencional $2.303 RT/F$ y ΔpH es la diferencia de pH, es decir:

$$\Delta\text{p} = \Delta\psi - Z\Delta\text{pH}$$

donde: $Z=60$ mV a 25°C cuando los potenciales están dados en mV y Δp alcanza un valor entre 180-220 mV (32,33). La energía de este gradiente puede ser usada para la síntesis de ATP ó bien para la translocación de solutos, por lo que los sistemas de transporte de la membrana mitocondrial están acoplados energéticamente al gradiente de protones generado por el transporte de electrones.

Los sistemas de translocación de solutos se pueden agrupar en tres grandes géneros de acuerdo al tipo de translocación que efectúan:

- a) Cuando la conducción del soluto a través de la membrana no está acoplada al traslado de otro, se les denomina uniporters.
- b) Cuando el desplazamiento de dos especies ocurre en la misma dirección y simultáneamente por el mismo acarreador, se les conoce como simporters.
- c) Cuando esta transposición sucede mediante un mecanismo antiparalelo con otro soluto, se les ha llamado antiporters (34).

Estos porters han sido identificados con mediciones directas de velocidades de transporte, como lo son por ejemplo: el hinchamiento mitocondrial (28,35) o por inhibición específica del acarreador (36,37). Además se ha estudiado el acoplamiento del transporte con el Δp mitocondrial para lo que ha sido de gran utilidad el uso de ionóforos, los cuales presentan como ventaja el hecho de que con ellos se pueden medir de manera separada tan-

to el potencial eléctrico como los gradientes de pH (38). Estas moléculas forman complejos lipofílicos con cationes, permitiendo su paso a través de la membrana; entre ellos se encuentra la nigericina, ionóforo carboxílico que a bajas concentraciones y a pH=7 es capaz de intercambiar K^+ por H^+ , y colapsar el ΔpH al provocar el eflujo de K^+ e influjo de H^+ cuando la concentración de K^+ externa es baja (39). Otras moléculas que pueden ser consideradas como ionóforos de protones, son los desacoplantes como el dinitrofenol y el carbonilcianuro de p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), los cuales colapsan tanto al componente eléctrico como al componente químico del Δp (40). Por lo tanto, el uso de este tipo de moléculas ha llevado a establecer dos variedades en el transporte, en cuanto a su acoplamiento con el Δp mitocondrial:

1. Transporte Electroneutro:

i) Cotransporte de anión con H^+ , por ejemplo: el transporte de $HPO_4^-/2H^+$ o bien, el simporter $H_2PO_4^-/H^+$.

ii) Antiport Cation/ H^+ , por ejemplo el antiport Na^+/H^+ .

Este tipo de transporte responde a cambios de pH y no de potencial eléctrico (41).

2. Transporte Electroforético. Este tipo de transporte responde a cambios en el $\Delta\Psi$, ya que existe una translocación de carga neta, por ejemplo, el realizado por el uniporter de Ca^{2+} cuya estequiometría de carga translocada es de +2 (42,43), o bien, el que realizarían los simporters propuestos por Mitchell (44,45) ya sea el de β -hidroxibutirato $^-/Ca^{2+}$ o el de $HPO_4^-/2Ca^{2+}$, los cuales poseen

una estequiometría de translocación de carga de +1.

III. TRANSPORTE DE Ca^{2+} MITOCONDRIAL.

A. PRIMERAS EVIDENCIAS.

Entre los primeros reportes acerca del comportamiento del ión Ca^{2+} en mitocondria, se encuentran: el de Lehninger (46) en el que observa que cuando adiciona Ca^{2+} a mitocondrias, se produce un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Asimismo, el de Siekevitz y Potter (47) en el que describen un aumento en la respiración de mitocondrias aisladas en ausencia de adeninnucleótidos. Posteriormente se empezaron a definir algunas características del proceso en relación con el mecanismo de transducción de energía, aunque ésto se hizo en condiciones experimentales no fisiológicas, ya que se usaban grandes cantidades de Ca^{2+} (1-5 mM) en el medio de suspensión, provocando una "acumulación masiva" del catión, cambios morfológicos de la mitocondria y daño irreversible en los mecanismos de control respiratorio y fosforilación oxidativa (48-52). Entre los puntos que se establecieron fueron:

a) La acumulación de calcio requiere del transporte de electrones debido a cualquier sustrato; b) el fenómeno requiere de la presencia de ATP o ADP, Mg^{2+} y P_i ; c) cuando hay entrada de cal-

cio a la mitocondria, no hay fosforilación oxidativa; d) la entrada del catión es inhibida por agentes desacoplantes; e) la oligomicina no inhibe al proceso; y f) algunas sales neutras (NaCl , KCl, LiCl) promueven la acumulación del catión divalente (49,53).

Sin embargo, se demostró que la acumulación de Ca^{2+} y Pi podía ocurrir en ausencia de transporte de electrones y ser sustentada por la hidrólisis de ATP (54), lo que se esperaría de un proceso de transporte quimiosmótico. Además, se advirtió que la adición de calcio a la mitocondria estimulaba la hidrólisis de ATP (54), así como la respiración; y que la acumulación del divalente promovida por la hidrólisis de ATP era inhibida por oligomicina (54,55).

Más tarde, se empezó a trabajar en condiciones de "acumulación limitada", es decir la concentración de calcio en el medio de suspensión se redujo considerablemente (<100 nmoles Ca^{2+} /mg proteína), previniéndose así la pérdida del control respiratorio o bien la capacidad de fosforilar ADP después de que se ha acumulado calcio en la mitocondria (51). En estas condiciones se reparó en el hecho, de que pequeñas adiciones de calcio a mitocondrias suspendidas en un medio que consistía en un buffer a pH 7.4, 80 mM de NaCl o KCl y un sustrato respiratorio, provocaron un aumento en el consumo de O_2 mayor que el producido por ADP, que después este consumo de oxígeno se frena y que prácticamente todo el calcio añadido desaparece del medio (56). Esta capacidad de la mitocondria para acumular Ca^{2+} en ausencia de Pi,

ADP o Mg^{2+} , se limita a aproximadamente 100 nmoles/mg proteína (57), siendo la relación de calcio acumulado por par de e^- por sitio de acoplamiento $+Ca^{2+}/2e^- = 2$ para distintos sustratos oxidables (56). Sin embargo, en la presencia de concentraciones ≈ 2.0 mM de Pi, se encontró menos del 10% del Ca^{2+} acumulado normalmente, efecto que se previene en presencia de ATP y Mg^{2+} al no permitir estas moléculas la salida del Ca^{2+} y Pi previamente acumulados. Bajo estas circunstancias, se puede encontrar una gran entrada de calcio >2500 nmoles Ca^{2+} /mg proteína mitocondrial (56). También se vió que al adicionar pequeñas cantidades de calcio a mitocondrias de hígado de rata, en presencia de 0.5 mM de ATP, se estimulaba la hidrólisis de este compuesto seguida de una represión de dicho fenómeno, durante el cual hubo una acumulación de Ca^{2+} y Pi (58).

Asimismo, se demostró (59) que cuando se estimula el consumo de O_2 al agregar calcio a un medio que contiene mitocondrias y que el primero se frena, el Ca^{2+} que se acumula no es secuestrado irreversiblemente por la mitocondria, sino que, por el contrario junto con el freno respiratorio coexiste un eflujo continuo del catión, contrabalanceado a su vez por una entrada continua de calcio dependiente de la respiración. Se vio igualmente que la velocidad de eflujo es altamente dependiente del pH y de la concentración salina (60), siendo mayor en un medio que contenga K^+ que en uno de Na^+ (61); que agentes desacoplantes como el 2,4-dinitrofenol, dicumarol y la gramicidina provocan también salida de calcio de mitocondrias previamente cargadas (61-63); y

que el proceso ya sea inducido o espontáneo, se ve acompañado de un influjo de H^+ en una relación aproximada de 1:1 (61-63).

En cuanto al movimiento simultáneo de otros iones con la entrada de Ca^{2+} se encontró que: a) el fosfato puede ser reemplazado por otros aniones permeantes como acetato, propionato, y arsenato, y no por bromuro, nitrato o cloruro (64); b) el medio de suspensión se acidifica al estimularse la respiración con Ca^{2+} (65,66), habiendo una consecuente alcalinización de la mitocondria (67) y; c) cuando las mitocondrias acumulan Ca^{2+} en presencia de P_i , existe también una entrada de nucleótidos de adenina. Si esta entrada es inhibida por atractilósido (inhibidor del antiport ATP^{-4}/ADP^{-3}), se inhibe también la acumulación de Ca^{2+} . Sin embargo, esta inhibición no ocurre en ausencia de P_i (68); y d) la concentración de $NaCl$, KCl , y el pH del medio de suspensión, pueden modificar la estequiometría entre la acumulación de Ca^{2+} , consumo de O_2 y salida de H^+ en ausencia de P_i u otro anión permeante (60,69), aumentándola de un valor cercano de 2 hasta una "superestequiometría" de 10 o hasta de 20.

Posterior a esta etapa de estudio en la que se dio evidencia de la relación que existía entre los movimientos de calcio con el mecanismo de transducción energética y con los cambios morfológicos de la mitocondria, se han venido desarrollando nuevos tópicos en el estudio del transporte de calcio mitocondrial, como son: el desarrollo del concepto de "acarreador" responsable del transporte y su aislamiento; el descubri-

miento de inhibidores específicos del transporte; la identificación de la fuerza primaria del mecanismo de transporte con uno o ambos componentes del potencial protón-motriz Δp ; la regulación del proceso; y la propuesta de varios modelos de translocación del divalente. Con ésto se han podido definir algunas propiedades tanto físicas como químicas del sistema de transporte de calcio.

B. PROPIEDADES DEL SISTEMA DE TRANSPORTE.

El hecho de que algún compuesto inhiba específicamente el movimiento de una molécula a través de la membrana, puede constituir una evidencia importante para la existencia de un sistema de transporte específico, lo que ha ocurrido para el transporte de calcio. Los inhibidores más estudiados son el La^{3+} y el Rojo de Rutenio. Se encontró (70-74) que el La^{3+} inhibe la transferencia de electrones en la mitocondria asociada al transporte de calcio, requiriéndose de 0.1-2 nmoles/mg proteína para lograr un 50% de inhibición. Esta inhibición es transitoria ya que desaparece después de unos minutos, lo que refleja que el La^{3+} es transportado al interior de la mitocondria (75). Más tarde se mostró que la inhibición es de tipo competitivo (73) y que la concentración de La^{3+} necesaria para inhibir específicamente al transporte de calcio es de 0.05-0.07 nmoles/mg proteína (74). En relación con el rojo de rutenio, se observó (76) que inhibía el trans

porte de Ca^{2+} y que la concentración requerida para alcanzar un 50% de inhibición es de aproximadamente 4 nmoles/mg proteína. Se demostró más tarde (77) que el rojo de rutenio inhibe también los sitios de alta y baja afinidad que fijan Ca^{2+} , esto a una concentración de 3-6 nmoles/mg proteína; en este trabajo se encontró también que este compuesto no inhibía la salida de Ca^{2+} de la mitocondria, lo que explica el hecho de que cuando la molécula se añade a las mitocondrias cuando éstas están acumulando calcio, se provoca un rápido eflujo del divalente (78). Sin embargo, este inhibidor presenta como inconveniente el hecho de que se oxida fácilmente bajo condiciones ácidas y que se adsorbe fuertemente tanto a vidrio como a cuarzo.

Además del estudio realizado con inhibidores, se ha desarrollado el concepto de "acarreador" a partir de estudios cinéticos (79) en los que se cuantificaron las velocidades iniciales del transporte de Ca^{2+} variando la concentración total del ión, con lo que se demostró que el sistema tiene una alta afinidad por Ca^{2+} libre ($K_m \approx 2-4 \mu\text{M}$) y; que el fenómeno cinético es saturable e hiperbólico, con un coeficiente de Hill de 1.7-1.8. También se determinó su selectividad iónica (74,75,80-83), la que resultó ser: $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{La}^{3+}$.

Por otra parte, se intentó medir la unión del ión Ca^{2+} al acarreador específico (84), encontrándose dos tipos de sitios de unión, unos de alta afinidad y otros de baja afinidad. La unión de Ca^{2+} a éstos últimos es sensible a Na^+ , K^+ y a anestésicos locales (85), lo que sugiere que estos sitios de unión sean

las cabezas polares de los fosfolípidos membranales. Aunque no se conozca el papel funcional de estos sitios que se encuentran tanto en la membrana interna como en la externa mitocondrial, se cree que no están directamente involucrados en el transporte de Ca^{2+} a través de la membrana interna mitocondrial.

Se ha intentado también aislar al acarreador, sugiriéndose que pudiera ser una glicoproteína (86-87); en este sentido, se ha publicado que esta glicoproteína presenta una actividad ionofórica dependiente del catión divalente. Por otro lado, estudios realizados en membranas lipídicas negras (88), muestran que la glicoproteína que fija Ca^{2+} no es selectiva; por lo que estos autores sugieren que las glicoproteínas que se han aislado son proteínas membranales extrínsecas que fijan Ca^{2+} , pero aún no el acarreador.

Más tarde, se aisló (89) un ionóforo de Ca^{2+} de la membrana interna mitocondrial de corazón de cabra, llamado "calci-forina", cuyo peso molecular es aproximadamente de 3000. Experimentos realizados con esta proteína en sistema de dos fases, demostraron que tenía una mayor selectividad hacia cationes divalentes que para los monovalentes; siendo la selectividad para los iones divalentes: Ca^{2+} , $\text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$. El estudio con inhibidores indicó que tanto el rojo de rutenio como el La^{3+} inhiben la extracción del Ca^{2+} al solvente orgánico, mediada por la proteína. Además, cuando se midió la translocación en una celda de Pressman, ésta resultó ser selectivamente promovida por un gradiente de iones hidrógeno.

C. MECANISMO MOLECULAR.

Los mecanismos de translocación propuestos hasta la fecha, se pueden considerar en cuanto al tipo de porter que acarrea al Ca^{2+} , es decir, uniport, antiport o simport; o bien, en cuanto a su acoplamiento con el Δp , ésto es, electroforético (con estequiometría de carga de +2, como el uniport $+\text{Ca}^{2+}$; con estequiometría de carga de +1, como los simporters $2\text{Ca}^{2+}/\text{HPO}_4^-$ y $\text{Ca}^{2+}/\beta\text{-hidroxibutirato}^-$), o el electroneutro (como el simport $\text{Ca}^{2+}/2\text{A}^-$ o el antiport $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$).

1. Transporte Electroforético.

La naturaleza de este proceso, es decir, la fuerza que promueve al fenómeno parece ser de carácter puramente electroforético, dada por el componente eléctrico de la fuerza protónmotriz generada en la respiración (30,43,82,90).

a. *Estequiometría de carga +2. Uniport $+\text{Ca}^{2+}$.*

Esta propuesta se ve apoyada por las siguientes evidencias: a) el proceso también se puede llevar a cabo gracias a un potencial artificial de K^+ generado a través de la membrana, por el ionóforo valinomicina (73). A mitocondrias inhibidas, suspendidas en un medio con 1 mM de KCl, se les agrega valinomicina, ésta provoca la salida del K^+ endógeno generando un potencial negativo interno, con lo que se promueve la entrada de Ca^{2+} a

la mitocondria, siendo la estequiometría de $2K^+/Ca^{2+}$ (91); b) el ión Ca^{2+} puede ser transferido pasivamente ("swelling" osmótico) como especie cargada en mitocondrias no energizadas junto con aniones permeantes de carga no localizada (SCN^- , NO_3^- , etc.) (82,92). Las mitocondrias sin energizar no se hinchan en presencia de 83 mM de $CaCl_2$ ya que la membrana interna mitocondrial no es permeable a iones cloruro, tampoco se distienden con 83 mM de acetato de calcio a menos de que esté presente un agente desacoplante conductor de protones, que permita la salida del protón que había entrado previamente con el ión acetato. Sin embargo, las mitocondrias se abultan rápidamente en presencia de 83 mM de NO_3^- , SCN^- , ClO_3^- y ClO_4^- de Ca^{2+} , como en este caso no se requirió de ningún agente desacoplante, ni tampoco estos agentes tuvieron algún efecto sobre el hinchamiento mitocondrial, se deduce que los aniones atravesaron a la membrana como tales y no como ácidos no disociados, junto con el ión calcio. El "swelling" osmótico generado por las sales de calcio de estos aniones fue inhibido tanto por La^{3+} , como por rojo de rutenio; c) se halló una relación de $2K^+/Ca^{2+}$ en mitocondrias que respiran, midiendo la concentración de $\{Ca^{2+}\}$ y $\{K^+\}$ intra y extramitocondrial en presencia de valinomicina (43); d) el acarreador sensible a rojo de rutenio de mitocondrias de corazón, cataliza el flujo de una carga positiva neta de +2 por cada ión calcio translocado. La entrada de calcio a las mitocondrias, así como la entrada de rubidio, se inicia con succinato en presencia

de valinomicina; cuando los flujos de estos cationes alcanzan el equilibrio se aplica la relación de Nernst: $\Delta E = \frac{RT}{F} \ln \frac{\{Rb^+\}_i}{\{Rb^+\}_e} = \frac{RT}{nF} \ln \frac{\{Ca^{2+}\}_i}{\{Ca^{2+}\}_e}$, donde ΔE es la diferencia de potencial eléctrico,

RT/F es el factor convencional, n es la carga neta transferida por calcio transportado y los subíndices i y e se refieren a intra y extramitocondrial, respectivamente. Así, :

$$\log\{Ca^{2+}\}_e = -n \log \frac{\{Rb^+\}_i}{\{Rb^+\}_e} + \log\{Ca^{2+}\}_i, \text{ si la concentración de}$$

$\{Ca^{2+}\}_e$ y la relación $\{Rb^+\}_i/\{Rb^+\}_e$ en el equilibrio se varían de tal manera que la concentración de $\{Ca^{2+}\}_i$ se mantenga constante, se puede predecir entonces una relación lineal, lo que permitirá conocer el valor de n . El valor de n obtenido cuando se varía el ΔE , es decir la relación $\{Rb^+\}_i/\{Rb^+\}_e$ con un agente desacoplante, así como la $\{Ca^{2+}\}_e$ de tal manera que $\{Ca^{2+}\}_i$ sea constante, fué de 2.1 (93); y e) la relación $H^+/Ca^{2+}=1.9$ en mitocondrias energizadas con succinato, en ausencia de movimiento de P_i por el simport P_i/H^+ (inhibido con N-etilmaleimida), indica que la salida de $2H^+$ debida a la oxidación de sustrato y la subsecuente generación de un potencial negativo interno, es lo que permite que un ión Ca^{2+} sea transportado (91).

b. Estequiometría de carga +1.

Se han sugerido mecanismos electroforéticos alternativos que implican una compensación de carga parcial, es decir una transferencia de carga neta de +1 (44,45,94), ésto en base a los

siguientes tipos de experimentos: a) mitocondrias equilibradas anaeróbicamente en el medio de suspensión a 25°C por 20 min., fueron inyectadas con una pequeña cantidad de H₂O₂ que sería descompuesta por catalasa existente en el medio, para iniciar la respiración. La cantidad limitante de equivalentes de ácido, exportada rápidamente durante el período de respiración y correspondiente al influjo de iones calcio, se usó para obtener la relación $\rightarrow H^+$ (ácido)/ $\leftarrow Ca$. En este tipo de experimentos se encontró que en ausencia de aniones que son translocados con H⁺ como sulfato, fosfato, o succinato, la relación $\rightarrow H^+$ (ácido) / $\leftarrow Ca \approx 1$, mientras que en su presencia esta relación fué mucho menor que 1. Es más, cuando el translocador de Pi/H⁺ fue inhibido con N-etilmaleimida (NEM), la relación recuperó su valor normal ≈ 1 . Cabe hacer notar que en presencia de β -hidroxibutirato la relación mencionada alcanza un valor de 1, lo que indica que este compuesto no esté siendo translocado con H⁺; b) la suspensión mitocondrial en estado 4 y a 25°C fué sometida a la adición de una pequeña cantidad de calcio. Para obtener la relación $\rightarrow H^+$ (ácido)/ $\leftarrow Ca$, se midió la cantidad de equivalentes de ácido expulsada durante el período de estimulación respiratoria y se le comparó con la concentración de sal de calcio adicionada, dando como resultado un valor ≈ 1 (94). Este resultado, lleva al análisis de un posible cotransporte con anión o bien de un antiport con H⁺.

i. Simport $2Ca^{2+}/HPO_4^-$.

Se indagó la estequiometría de entrada de Ca^{2+} con Pi a la mitocondria en presencia de NEM, resultando ser de 2 y por lo tanto la transferencia de carga neta de +1, ésto se llevó a cabo midiendo inicialmente la concentración de Ca^{2+} y Pi en el medio anaerobio y restándolo de las concentraciones obtenidas en condiciones aerobias. La propuesta de este simporter insensible a NEM y sensible a La^{3+} surge de los resultados obtenidos en experimentos de consumo de O_2 y cambios de pH, usando Sr^{2+} en lugar de Ca^{2+} , que a continuación se describen: a) al agregar Sr^{2+} al medio, aumenta el consumo de O_2 (indicando entrada del metal) y la salida de protón (oxidación de sustrato); al agregar Pi aumenta el consumo de O_2 (entra Sr^{2+}), entra H^+ (indicando entrada de Pi por el acarreador Pi/H^+ , abatiendo el ΔpH , lo que promueve el aumento de consumo de O_2 y entrada de Sr^{2+}); b) los mismos experimentos anteriores pero en presencia de NEM. Al agregar Sr^{2+} ocurre exactamente lo mismo; al agregar Pi no hay entrada de H^+ (indicando que tampoco entra Pi por el acarreador Pi/H^+), al parecer aumenta el consumo de O_2 (un trazo muy poco evidente), así como los protones del medio (ésto indicaría que el Sr^{2+} está entrando a la mitocondria gracias al Pi pero por un acarreador distinto al simporter Pi/H^+ , es decir, por un acarreador $\text{Sr}^{2+}\text{-Pi}$ en el que al entrar el H_2PO_4^- deja un H^+ en el exterior); c) al agregar La^{3+} antes de Sr^{2+} se inhibe la respiración y el eflujo de H^+ (indicando inhibición del transporte); d) cuando se agrega La^{3+} después de Sr^{2+} y por último Pi, se observa que no se estimula el consumo de oxígeno al agregar Pi (el acarreador está

inhibido por La^{3+}), hay entrada de H^+ (via acarreador del ácido fosfórico Pi/H^+) y; e) se midió la aparición neta de H^+ en el medio durante la entrada de calcio y ésta concordó con la calculada para el simporter $(\text{Ca}_2)^{4+}-\text{HPO}_4^-$ (44).

ii. Simport Ca^{2+} /monocarboxilato $^-$.

Este modelo emerge como en el caso anterior de mediciones de consumo de O_2 y movimientos de H^+ , que a continuación se describen: a) se agregó primeramente un pulso de SrCl_2 a mitocondrias respirando en estado 4, lo que aumentó el consumo de O_2 y disminuyó el pH del medio (indica entrada de calcio en el simporter Ca-Pi, explicándose la disminución de pH por la liberación del H^+ del ácido fosfórico para poder ser acarreado en simport con calcio). Si se agrega 10 mM de formato, aumenta el consumo de oxígeno y el medio se alcaliniza (entra más calcio debido a que el ácido fórmico colapsa el ΔpH). En el caso de que el transporte de calcio estuviera rigurosamente acoplado a Pi por el simporter, esta última entrada debida a formato es explicada por los autores como originada por la salida de ácido fosfórico debida al colapso del ΔpH , para volver a entrar con el metal mediante el mecanismo de simport planteado; b) se hizo lo mismo que para el inciso anterior, pero se agregó 10 mM β -hidroxibutirato de colina, en lugar de formato, obteniéndose aumento en el consumo de oxígeno y alcalinización del medio (entrada como ácido butírico); c) los experimentos anteriores se realiza-

ron ahora en presencia de NEM, permaneciendo el consumo de oxígeno igual que sin este inhibidor (el Sr^{2+} entra a la par con β -hidroxibutirato) y presentándose una alcalinización del medio, menor, ya que el porter de ácido fosfórico está inhibido; d) se observó también que en presencia de La^{3+} , el β -hidroxibutirato no estimula el consumo de O_2 , por lo que se infiere que el sistema Ca^{2+}/β -hidroxibutirato $^-$ es sensible a La^{3+} ; e) la especificidad del acarreador se hace evidente hacia β -hidroxibutirato (2,10,20 mM), solo si se inhibe la recirculación de Pi, sobre otros aniones como formato, acetato, butirato y bicarbonato; y f) por último, se estimaron las velocidades de entrada de Ca^{2+} a partir de las pendientes de los experimentos de consumo de O_2 , observándose diferencia entre la velocidad de entrada con Pi y la obtenida para β -hidroxibutirato $^-$, de donde se concluye que son distintos acarreadores (45).

iii. Antiport $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$.

Es planteado como resultado de un estudio cinético del acarreador donde se analiza el efecto del pH sobre las constantes de velocidad y en el que se encuentra que graficando $\log V/K_m$ vs pH, existe una intersección de dos asíntotas a pH 7.8, lo que se interpreta como el pK_a del grupo que se une inicialmente a Ca^{2+} y que es funcional en el estado disociado. El efecto estimulante sobre el transporte de Ca^{2+} , de los ácidos permeantes como el Pi se atribuyó a que éstos propician la libera-

ción de Ca^{2+} del acarreador a la fase interna, lo que se ve reforzado por la ausencia del efecto en presencia del ión SCN^- (79).

2. Transporte Electroneutro.

a. *Símport* $\text{Ca}^{2+}/2\text{A}^-$.

Se ha formulado este tipo de mecanismo con base en experimentos en los que se muestra que la entrada de calcio a la mitocondria debida únicamente a la oxidación de sustrato, se produce ante la presencia de un anión, como el HCO_3^- formado del CO_2 disuelto en el medio de suspensión. Si este CO_2 es eliminado ya sea al agregar Diamox (inhibidor de la anhidrasa carbónica) o bien al pregasear la muestra con O_2 , no se observa entonces entrada alguna de calcio. Para determinar la estequiometría entre la entrada de calcio y un anión dado, se inhibió el transporte de Pi con mersalil y a la ATPasa con oligomicina; se probaron distintos aniones marcados con ^{14}C (lactato, β -hidroxibutirato y acetato) y se encontró que el número de equivalentes de anión acumulado es igual al número de equivalentes de ión Ca^{2+} transportado. Las mediciones de pH, mostraron que la entrada de calcio simultánea a la de aniones de ácidos débiles, no provocó una acidificación; este hecho fue explicado por el autor considerando que a pH 7.2 estos ácidos están disociados, de tal manera que al entrar a la mitocondria no estén

siendo una fuente de H^+ , ya que éstos ya existían como tales (95).

b. *Antiport* $Ca^{2+}/2H^+$.

La descripción de los trabajos que apoyan la existencia de este tipo de antiport, se hará más adelante cuando se discuta el influjo y eflujo del catión divalente (reciclaje) (96).

3. Transporte de Ca^{2+} y Pi. Vías separadas.

Como ya se señaló en párrafos anteriores, se había considerado obligatorio al Pi en el transporte de Ca^{2+} (44), o bien con una acción indirecta al bajar el pH intramitocondrial promoviendo la asociación del acarreador con H^+ y provocando que éste liberara al calcio; esto con base en que la velocidad inicial del transporte de calcio aumenta, al estar en presencia de Pi (79). Sin embargo, otros autores han hallado pruebas en contra de esta dependencia directa señalada, como son: a) que el transporte de calcio en mitocondrias depletadas de Pi ocurre con una velocidad inicial idéntica en ausencia o presencia de mersalil (inhibidor del simport Pi/H^+) (97); b) la cantidad de mersalil requerida para inhibir completamente al acarreador de fosfato, es muy similar a la que se requiere para prevenir completamente el efecto de Pi sobre la acumulación de Ca^{2+} (97); c) la velocidad inicial de entrada de calcio a mitocondrias energizadas, es constante en presencia o ausencia de NEM (91); d) en presencia de NEM, el trans-

porte de calcio que se lleva a cabo, no ocurre en cotransporte con Pi (91) y; e) durante el transporte de calcio, con NEM en el medio, la velocidad de salida de H^+ y la cantidad que es expulsada aumenta, posiblemente debido a la inhibición del acarreador de Pi^+/H^+ , la que impide la recirculación de protón via este acarreador (91).

En consecuencia, se concluye que cuando se acumula calcio en mitocondrias energizadas en presencia de NEM, su entrada se ve severamente limitada por la formación de un ΔpH muy grande debida a la alcalinización de la matriz mitocondrial, originada por el bombeo de H^+ al exterior sin que éstos vuelvan a entrar. Sin embargo, cuando entran compuestos con H^+ (fosfato o ácidos libres lipofílicos), la alcalinización del medio se ve a mortiguada, limitándose el ΔpH , y manteniéndose el $\Delta \Psi$ a un nivel compatible con la retención y mayor acumulación de calcio.

4. Reciclaje de Ca^{2+} .

Desde 1965 (59), se sugirió que la acumulación de Ca^{2+} en mitocondria podría ser un estado estacionario establecido entre un influjo dependiente de la respiración y un eflujo continuo. La propuesta de la existencia de dos vías separadas e independientes, se ha tomado como la mejor manera de explicar la desviación del equilibrio nernstiano de las concentraciones de Ca^{2+} en el interior de la mitocondria y el citoplasma. Dicha hipótesis ha sido apoyada por experimentos con mitocondrias intactas y con vesículas invertidas en los que el rojo de rutenio es

timula la salida de calcio. A continuación se describen los mencionados experimentos; a) el estudio realizado en partículas submitocondriales de polaridad invertida demuestra que sólo se acumula calcio en presencia de rojo de rutenio, que este fenómeno no requiere de ATP, succinato y Pi, y que es sensible a oligomicina; por lo que se propone que el acarreador para el influjo es sensible a rojo de rutenio (RR), mientras que el de eflujo no lo es; asimismo, que el eflujo y no el influjo ocurre en cotransporte con Pi (98); b) sin embargo, otras observaciones en vesículas invertidas y energizadas muestran que la entrada de calcio a ellas no requiere del movimiento simultáneo de Pi y Ca^{2+} , sino que es suficiente con que el Pi esté dentro de la vesícula para que el calcio penetre y también que este fenómeno es sensible a RR (99); c) en mitocondrias intactas que respiran, se ha visto que hay eflujo de calcio debido a la adición de acetato (AcAcO^-) en el medio, el cual no es prevenido por RR sino que por el contrario es aumentado, ya que al inhibir el influjo del catión con él, el eflujo se hace más evidente (100) y; d) las mitocondrias de corazón que oxidan succinato acumulan calcio, este proceso se inhibe con RR mientras que la presencia de iones Na^+ induce el eflujo del divalente, siendo éste último vedado con La^{3+} (101).

a. Regulación del Eflujo.

Se ha detectado la dependencia del eflujo de calcio con

respecto al sodio, en mitocondrias de algunos tejidos como son: glándula parótida bovina, corteza suprarrenal, cerebro, músculo dorsal de conejo, músculo masetero, mientras que en otros no existe, e.g. riñón, hígado, pulmón, músculo iliaco y músculo del útero (102). El estudio antes mencionado se realizó con mitocondrias energizadas con succinato, a las que después de haber acumulado Ca^{2+} se les inhibió con RR, de tal manera que el proceso de influjo se mantuviera inhibido mientras el de eflujo se llevaba a cabo. También se ha propuesto que este proceso es regulado por el estado de óxido-reducción de los piridínnucleótidos; ésto con base en experimentos realizados con mitocondrias respirando con succinato en presencia de rotenona, en los que al añadir un agente oxidante como el AcAcO^- se provoca la oxidación del NADH existente a NAD^+ , lo que origina un eflujo de calcio. Aún más, en presencia de un agente reductor como el β -hidroxibutirato, el NAD^+ se reduce a NADH causando un influjo de calcio (100). En cuanto al posible papel regulatorio del Pi sobre el eflujo de calcio, además de los trabajos realizados en vesículas invertidas ya mencionados (98-99), se ha estudiado en mitocondrias depletadas de fosfato, en las que se observó que el proceso no se lleva a cabo en cotransporte con Pi, ni que requiere de él (91) (ausencia total de movimiento de Pi). Asimismo, se ha sugerido un papel regulatorio para los ácidos grasos, teniendo como apoyo experimentos en los que se permite la entrada de calcio a mitocondrias energizadas provocando una salida subsecuente del catión con ellos; esta salida se ve incrementa-

da si el influjo se inhibe con RR y si el catión monovalente en el medio es Cs^+ , siendo la selectividad para estos cationes: $\text{Cs}^+ > \text{K}^+ \gg \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ (103).

b. *Mecanismos de Translocación.*

Para el caso de los sistemas en los que el ión Na^+ estimula el eflujo de Ca^{2+} , se ha propuesto que el translocador es de tipo antiport $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$, aunque la estequiometría no ha sido definida (101). En cambio, en mitocondrias de hígado se ha formulado la existencia del antiport electroneútro $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$, apoyada en pruebas llevadas a cabo en mitocondrias energizadas depletadas de Pi, en las que se provoca el eflujo con RR y acetato y en las que se mide la relación: $\text{Influjo } \text{H}^+ / \text{Eflujo } \text{Ca}^{2+}$ dando un valor =1.9 (96). Sin embargo, el reverso del acarreador del influjo puede ocurrir parcialmente, lo que explicaría el eflujo causado por desacoplantes que previenen o colapsan la formación del $\Delta\Psi$ y ΔpH , ya que los sistemas postulados previamente $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ y $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ no requieren necesariamente de la caída de potencial (104). En relación al acoplamiento entre el reciclaje con el Δp , se ha llegado casi a un total acuerdo de que a lo que se refiere al influjo del catión, éste es un movimiento electroforético acoplado al $\Delta\Psi$ mitocondrial (30,43,73,82,90-93), aunque sin embargo, se ha observado que la nigericina a concentraciones a las que intercambia K^+/H^+ , aumenta la acumulación de calcio (1) en mitocondrias depletadas de Pi y que respiran tenien

do como sustrato β -hidroxibutirato. Como ya se había mencionado con anterioridad, éste es el fenómeno que se estudiará cinéticamente en el presente trabajo. También se han podido observar flujos de calcio debidos a cambios de ΔpH provocados con nigericina, en mitocondrias inhibidas metabólicamente, siendo la entrada de Ca^{2+} anulada con RR y favorecida con desacoplantes (105). Recientemente se ha demostrado midiendo cambios de potencial espectrofotométricamente (con safranina), que durante el influjo de calcio ocurre un cambio de potencial, mientras que durante el eflujo no lo hay, siempre y cuando el proceso de entrada a la mitocondria esté inhibido con RR (106).

c. *Varios Acarreadores o un Canal Asimétrico.*

Una de las bases principales para favorecer la hipótesis de que en realidad existen varios acarreadores, es el hecho de que durante el eflujo de calcio el RR permanece unido al acarreador (107); sin embargo, la propuesta de que el sistema es un canal se deriva de un estudio comparativo de las gráficas de Arrhenius de compuestos que se sabe son acarreadores o canales, con el sistema de transporte de calcio. En él se analizó la velocidad de entrada del catión mediada por un gradiente de K^+ , en mitocondrias inhibidas. La ausencia de quiebre en la gráfica de Arrhenius obtenida, similar a la encontrada para el transporte con gramicidina (canal); la baja entalpía de activación; el alto número de conversión y; la inhibición asimétrica del transporte, sugieren que este último se lleva a cabo a través de un canal (108).

M A T E R I A L E S

I. REACTIVOS QUIMICOS.

Los compuestos empleados, fueron grado reactivo analítico de casas comerciales conocidas (Merck, J.T. Baker, Sigma). El antibiótico Nigericina fué obsequio del Dr. Marvin Gorman, Eli Lilly Laboratories, Indianapolis, EUA. El agua empleada en la preparación de soluciones fué bidestilada en un destilador de vidrio.

II. APARATOS.

1. Centrífuga Refrigerada Automática "DuPont Instruments/Sorvall", Modelo RC-5. DuPont Company. Instrument Products Division Sorvall Operations, Newtown, Conn. EUA.

2. Espectrofotómetro Carl Zeiss, Modelo PM 6 KS. Carl Zeiss de México, S.A.

3. Baño de agua a temperatura constante. Grant. Cat., Modelo SP-50-1, EUA.

4. Espectrofotómetro Aminco DW-2a, UV-VIS. American Instrument Co. Division of Travenol Lab., Inc. Silver Spring, Ma. EUA.

074824

M E T O D O S

I. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS.

Las mitocondrias que se utilizaron en todos los experimentos fueron de hígado de rata blanca macho (150-200 g). Se aislaron y purificaron siguiendo el método estándar de centrifugación diferencial de Johnson y Lardy (109), que a continuación se describe.

El hígado una vez extraído y lavado, se pesa, se corta finamente con tijeras y después se homogeneiza en un medio de sacarosa 0.08M, manitol 0.25M, etilendiamintetraacetato de sodio (EDTA) 0.001M ajustado a pH 7.4 con trietanolamina (TEA) (1g de tejido/10 ml de solución). El homogeneizado se centrifuga a ²⁶⁰⁰ ~~600~~ rpm x g durante 15 min., para separar las células enteras, tejido intacto y núcleos. El sobrenadante se recentrifuga a ¹²⁵⁰⁰ ~~17000~~ rpm x g durante 10 min., para separar la fracción mitocondrial. El sobrenadante se descarta y la pastilla se resuspende manualmente en un medio de sacarosa 0.08M, manitol 0.25M ajustado a pH 7.4 con TEA y se centrifuga nuevamente a ¹²⁵⁰⁰ ~~17000~~ rpm x g por 10 min. Este lavado es con objeto de liberar a la preparación mitocondrial, de microsomas, lisosomas y fragmentos de membrana. La pastilla obtenida se resuspende finalmente en sacarosa 0.25M a pH 7.4 ajus

tado con TEA (2 g de tejido de hígado/ml). Durante todo el procedimiento la temperatura se mantiene de 0-4 °C.

II. DEPLECION DE P_i ENDOGENO.

En lugar de resuspender la pastilla final obtenida por el método anterior, en sacarosa 0.25M a pH 7.4, las mitocondrias aisladas se resuspenden en un medio que contiene: 2mM NaADP (pH 7.4), 2mM β -hidroxibutirato-TEA (pH 7.4), 1mM EDTA-TEA (pH 7.4) y 10 mM TEA-Cl (pH 7.4). Se utilizan 5 ml de medio/g de hígado húmedo (110). Una vez resuspendidas las mitocondrias, se incuban por 10 min a 30°C agitando suavemente. Inmediatamente, se centrifugan a 17 000 x g durante 10 min, para obtenerlas en forma de pastilla. Posteriormente se lavan dos veces con sacarosa 0.08 M y manitol 0.25 M ajustados a pH 7.4. Finalmente, la pastilla obtenida se resuspende en sacarosa 0.25 M a pH 7.4 ajustado con TEA (2 g de tejido de hígado/ml). A excepción del período de incubación, todo el proceso se lleva a cabo a una temperatura de 0-4°C.

III. DETERMINACION DE PROTEINA.

El método empleado fue el de Biuret (111). A 0.02 ml de la muestra mitocondrial, se le adicionan 0.2 ml de una solución de desoxicolato de sodio (DCO) al 5% (en NaOH 0.01 N),

se agita y en seguida se añaden 1.28 ml de agua y 1.5 ml de reactivo de Biuret. Se incuba a 37°C durante 15 min y se lee a 540 nm contra un blanco de DCO, reactivo de Biuret y agua. La curva estándar se prepara con albúmina de bovino cristalizada, a varias concentraciones, de 1-8 mg/ml de proteína.

Reactivo de Biuret: 1.5 g de sulfato de cobre pentahidratado, 6.0 g de tartrato de sodio y potasio y 300 ml de hidróxido de potasio al 10%, llevados a 1 lt con agua bidestilada.

IV. DETERMINACION DE ESPECTROS DIFERENCIALES.

Para obtener este tipo de espectros, se usó el espectrofotómetro Aminco DW-2a de doble rayo, en su modalidad de operación "split beam", en el que con un solo monocromador se hace un barrido a lo largo del rango de longitudes de onda seleccionadas. En general, para graficar la línea basal, tanto la celda de referencia como la usada para la muestra, se llenan con sustancias idénticas y se colocan en los compartimientos correspondientes; en seguida se hace pasar un solo rayo de luz monocromático, dividido en dos por el espejo rotatorio fraccionante, alternativamente a través de las celdas de referencia y muestra. Esta radiación fraccionada, minimiza cualquier desigualdad entre los rayos de referencia y muestra, produciendo una línea basal relativamente recta. Después de que se

ha graficado la línea basal, la celda correspondiente a la muestra se altera químicamente, con lo que se graficará, el espectro de la diferencia entre la muestra y la referencia. A continuación se describen el funcionamiento óptico y las vías que siguen las señales, como se muestra en la Fig. 2:

La radiación proveniente de la lámpara de ultravioleta (UV) o bien de la lámpara del visible (VIS), es afocada por el espejo 1 (E_1) a la rendija de entrada hacia el monocromador 1 (MONO 1). El obturador 1 (O_1), se coloca de tal manera que solo un rayo pase a través de la máscara divisoria del rayo (M). Este rayo es colimado por el espejo 2 (E_2) y difractado por el MONO₁; la radiación monocromática que resulta es afocada por el espejo 3 (E_3), a la rendija de salida. El lente "zoom" (Z), corrige al rayo de cualquier aberración cromática y automáticamente lo mantiene afocado a un punto determinado en el compartimiento de la muestra, sin importar la longitud de onda. El rayo es reflejado a la muestra (M) y a la referencia (R) en forma alternada, por el espejo rotatorio fraccionante (E_4) y por el espejo fijo (E_5), respectivamente. En este punto, las señales de ambos rayos se igualan con un atenuador (AS). Después de que el rayo ha pasado a través de la muestra y la referencia, llega al cátodo del tubo fotomultiplicador (FM) que genera dos señales de corriente separadas en el tiempo. Estas corrientes se convierten en señales de la muestra y de la referencia, siendo aplicadas a los amplificadores respectivos.

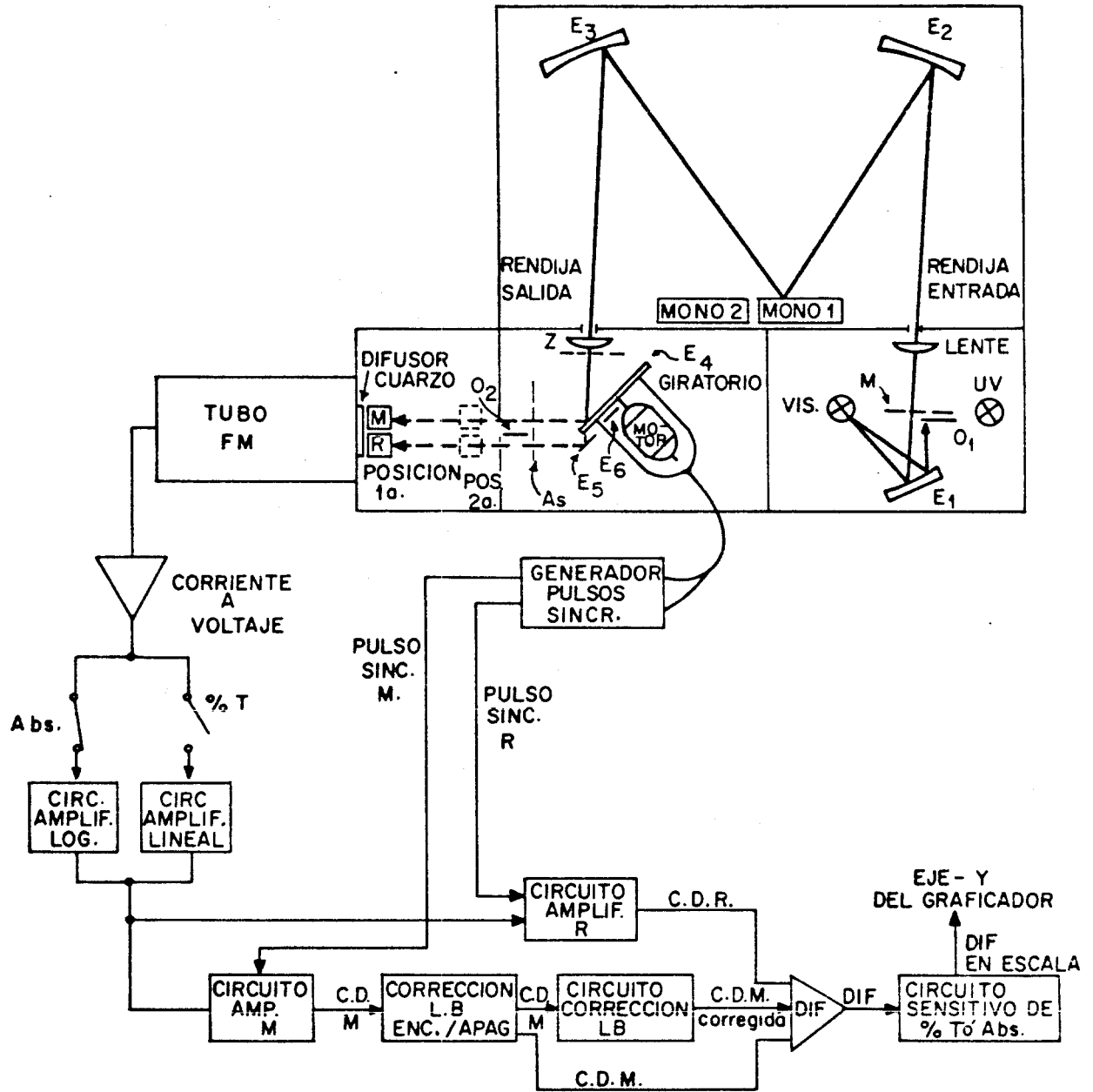


FIG. 2 DIAGRAMA FUNCIONAL. MODALIDAD "SPLIT BEAM"
(Explicación en el texto).

El espejo E_4 produce pulsos de sincronización óptica que generan: pulsos de sincronización de referencia que dan salida a señales de referencia a través del amplificador respectivo; pulsos de sincronización de muestra que dan salida a señales a través del amplificador de la muestra; y señales de tiempo para mantener la velocidad del motor del espejo E_4 a 250 ó a 1000 Hz. Las salidas de los amplificadores de referencia y muestra son señales de corriente directa (CD). La señal CD de la muestra puede ser corregida por el circuito de corrección de la línea base (LB) y aplicada junto con la señal CD de referencia, al amplificador diferencial (DIF); este amplificador toma la diferencia entre las dos entradas y la aplica al circuito de absorbancia (Abs) o al de transmitancia (T), el cual atenúa la señal diferencial y la aplica en escala al eje Y del graficador.

V. DETERMINACION DE LA CINETICA DE PEQUEÑOS CAMBIOS DE ABSORBENCIA.

Esta determinación se logra con el espectrofotómetro Aminco DW-2a en su modalidad de operación "longitud de onda-dual" y se obtiene haciendo pasar dos rayos de luz monocromáticos de distintas longitudes de onda de manera alternativa, a través de una celda. A uno de estos rayos se le denomina de referencia (R) y al otro de la muestra (M); como ambos rayos pasan a través de la misma porción de la celdilla, ésto cancela los efectos que

podieran tener tanto el asentamiento de la muestra, como la dispersión de luz causada por la misma. Cuando se induce un cambio químico en la muestra, el valor de la absorbencia para el rayo con una λ_1 cambia, así como la absorbencia para el rayo con λ_2 , obteniéndose el espectro de la diferencia de estos cambios de absorbencia con respecto al tiempo. Por lo tanto, empezando con una diferencia de cero, se podrán ir midiendo - subsecuentemente los cambios de absorbencia que ocurran en la muestra. A continuación se describen el funcionamiento óptico, y las vías que siguen las señales, como se muestran en la Fig. 3:

La radiación de la lámpara del visible (VIS) o la que proviene de la lámpara del ultravioleta (UV), se afoca mediante el espejo 1 (E_1) por la rendija de entrada a los monocromadores MONO 1 y MONO 2. El obturador 1 (O_1) se coloca en una posición que permita el paso de dos rayos a través de la máscara divisoria (M), estos rayos son colimados por el espejo 2 (E_2) y difractados, uno por el MONO 1 y el otro por el MONO 2. Los rayos monocromáticos resultantes se afocan con el espejo 3 (E_3) a la rendija de salida y el lente "zoom" (Z) los corrige de aberraciones crómicas y los mantiene automáticamente afocados en un punto fijo en el compartimiento de la muestra, sin importar la longitud de onda. En seguida, los dos rayos se igualan en intensidad con el atenuador dual (AD), este balanceo niega la absorbencia absoluta de la muestra a las longitudes de onda seleccionadas y minimiza el efecto de dispersión de la luz. Después

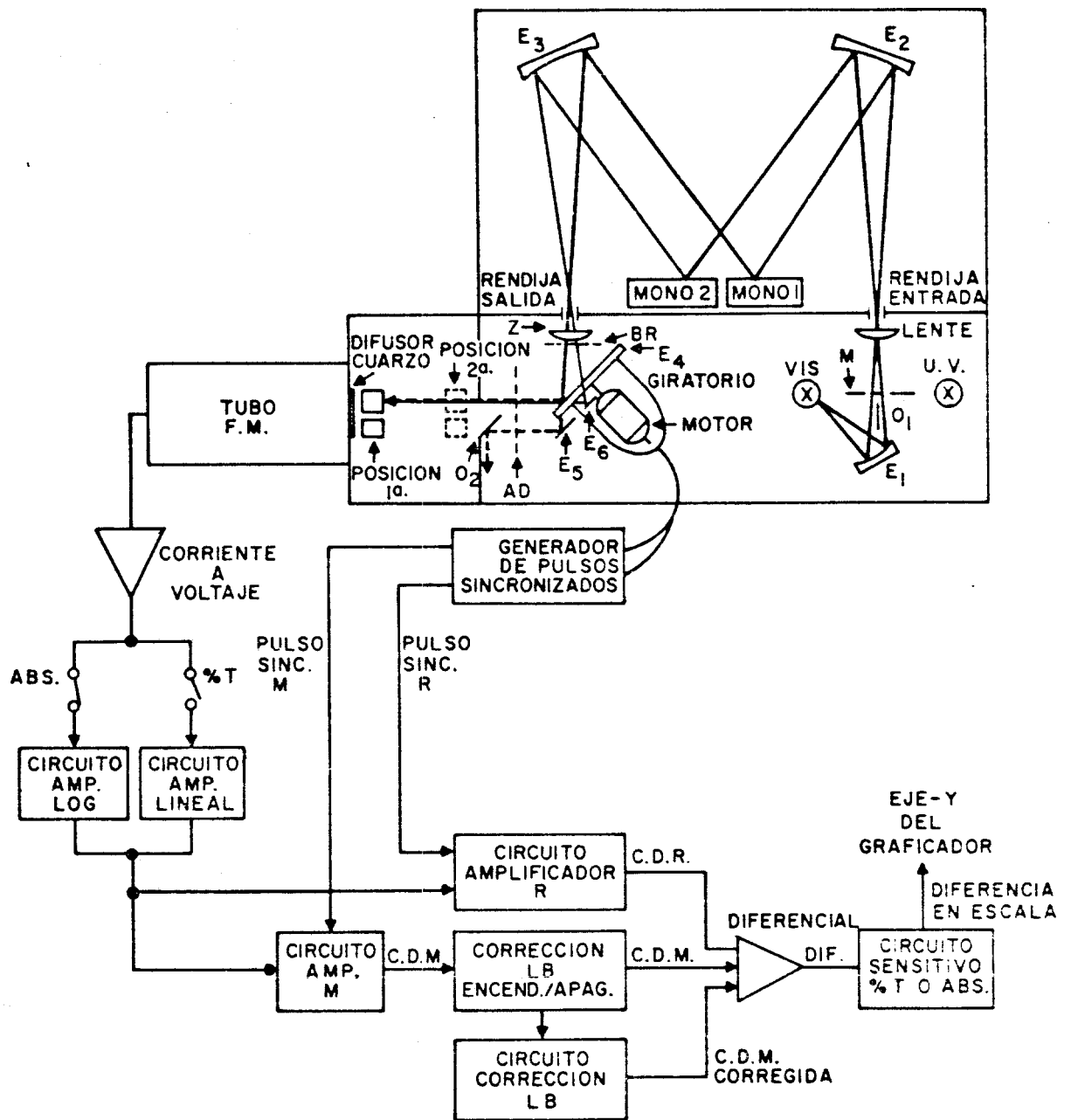


FIG. 3 DIAGRAMA FUNCIONAL. MODALIDAD "DOBLE RAYO"
(Explicación en el Texto).

de ser igualados, ambos rayos son reflejados de manera alterna en la celdilla de la muestra, de la siguiente manera: el espejo giratorio (E_4) tiene 4 espejos espaciados a la misma distancia, cada revolución del motor corresponde a 4 ciclos, la mitad de un ciclo consiste en el tiempo en que uno de los espejos rotantes está interceptando al rayo y la otra mitad, al tiempo en que el rayo pasa entre dos de los espejos giratorios. Durante una porción del ciclo, el rayo MONO 1 es reflejado por este espejo a la celda de la muestra y en este momento, el rayo MONO 2 es bloqueado por el mismo espejo; al girar el espejo y dejar el paso libre a los dos rayos, el rayo MONO 2 es reflejado por el espejo 6 (E_6) a la muestra, mientras que el rayo MONO 1 es reflejado por el espejo 5 (E_5) al obturador 2 (O_2) que lo bloquea. Así, durante la mitad del ciclo, el rayo MONO 1 es reflejado a la muestra y durante la otra mitad, el rayo MONO 2 es el reflejado. Después de que los rayos MONO 1 y MONO 2 pasan a través de la muestra, prosiguen alternativamente al cátodo del tubo fotomultiplicador (FM), en el que se generan dos señales de corriente separadas en el tiempo. Estas corrientes se convierten en las señales de referencia y muestra, y se aplican a los amplificadores respectivos. El espejo giratorio (E_4) produce pulsos de sincronización óptica que generan: pulsos de referencia sincronizados, que dan salida a señales de referencia a través del amplificador de referencia; pulsos de la muestra sincronizados que dan salida a señales de muestra mediante el amplificador de la muestra; y señales de tiempo que mantienen

la velocidad de este espejo a 250 ó 1000 Hz. Las salidas de los amplificadores de la muestra y de la referencia son de corriente directa (CD). Tanto la señal R, como la señal M, son aplicadas directamente al amplificador diferencial, este amplificador toma la diferencia entre estas dos señales y la aplica al circuito de absorbencia (ABS.) o al de transmitancia (T). Este circuito atenúa la señal diferencial y la aplica en escala al eje Y del graficador.

VI. MEDICION DEL TRANSPORTE DE Ca^{2+} .

Se han descrito varios métodos para medir el transporte de calcio de sistemas biológicos; entre los procedimientos más comunes están el de la distribución isotópica, espectroscopía de absorción atómica, electrodos específicos e indicadores fotoluminiscentes, fluorescentes y absorbentes (112-124).

Los indicadores de calcio absorbentes han sido utilizados para medir la cinética del transporte en células y en fracciones celulares, como mitocondrias; estos indicadores metalocrómicos son sustancias que cambian el color cuando la concentración de calcio en la solución cambia, siendo la diferencia de color entre el indicador libre (Ind) y el complejo indicador-calcio ($Ind-Ca^{2+}$), grande, por lo que pueden ser usados para determinar cuantitativamente la concentración del metal en el medio (119-124).

Aunque una gran variedad de sustancias puedan formar

adecuadamente complejos con calcio, para medir su transporte deben cumplir con los siguientes requisitos: a) el indicador debe ser soluble en agua y tener el mínimo coeficiente de partición en la porción apolar de la membrana, lo que no permite la unión o penetración del indicador a ella. Así, los cambios de absorbencia pueden relacionarse con la concentración de Ca^{2+} en la solución extramitocondrial; b) el indicador no debe tener efectos laterales sobre la función y estructura celular, en este caso de la mitocondria; c) debe ser selectivo para calcio, lo que quiere decir, que debe reaccionar solo con calcio o bien, que el complejo Ind-Ca^{2+} posea propiedades físicas o químicas particulares, de tal manera que aunque la reacción del indicador con el Ca^{2+} no sea específica, se pueda lograr o aumentar la selectividad al escoger las condiciones experimentales apropiadas y así detectar el transporte de calcio en presencia de otros cationes. La medición selectiva del transporte de calcio en presencia de otros iones, generalmente se logra seleccionando el par de longitudes de onda adecuado. Se debe tener cuidado de excluir cualquier interferencia cruzada de H^+ , Na^+ , K^+ y Mg^{2+} , los cuales además de estar presentes en la preparación biológica, se redistribuyen durante su funcionamiento; d) la constante de velocidad de formación del complejo Ind-Ca^{2+} debe ser lo más alta posible, para que el transporte que se está midiendo tenga un tiempo de resolución aceptable. Esta es una de las mejores ventajas que ofrecen estos indicadores, sobre las otras técnicas, ya que se pueden obtener cinéticas en

el orden de los mseg o μ seg. La cinética del transporte debe ser más lenta que el tiempo de relajación del complejo Ind-Ca^{2+} ; e) las longitudes de onda que se escogen deben seleccionarse de tal manera que la absorbencia del indicador pueda ser detectada sin interferencia de cambios de absorbencia no específicos, estos cambios de absorbencia surgen del "swelling" o bien de cambios de absorbencia de pigmentos presentes en la mitocondria y se pueden evitar mediante el uso de la técnica de doble rayo o midiendo el cambio de absorbencia del indicador en un área del espectro en donde los pigmentos no absorban; f) el coeficiente de absorbencia diferencial Δ_{ϵ} , entre el indicador libre y el complejo Ind-Ca^{2+} debe ser lo más grande posible, ya que esto permite que con pequeñas concentraciones de indicador, se puedan medir los cambios de concentración del catión y, g) la afinidad del indicador por el calcio debe ser relativamente baja, de tal manera que durante la medición la mayor parte del indicador esté libre, lo que permitirá una linealidad en la curva de titulación y también que no se modifique la concentración de calcio libre debido a la presencia del indicador. Por lo tanto, aunque los cambios de absorbencia que se miden son función del complejo Ind-Ca^{2+} , el equilibrio $\text{Ind} \rightleftharpoons \text{Ind-Ca}^{2+}$ debe estar desplazada hacia la izquierda, lo que indica que la concentración de calcio en el medio de reacción debe ser menor que la K_D entre el indicador y el calcio.

A. SELECCION DEL INDICADOR.

En la siguiente tabla se muestran las propiedades de los indicadores metalocrómicos para Ca^{2+} , más usados:

TABLA I

PROPIEDADES DE LOS INDICADORES MUREXIDO, ARSENAZO III Y ANTIPIRILAZO III.

	Muréxido	Arsenazo III	Antipirilazo III
P.M.	284	776	746
Solubilidad H_2O	> 20 mM	> 50 mM	> 20 mM
Unión a células o a fracciones celulares.	-	-	-
Efectos laterales sobre estructura y función.	-	-	-
Ind- Ca^{2+} :			
K_D (a 50 mM y 0.5M KCl).	1-3 mM	15-60 μM	60-400 μM
Δ_ϵ ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	~ 6	~ 25	~ 7
Tiempo relajación.	< 2 seg	> 2.8 mseg	180 μseg

La selección se realizó básicamente tomando como punto de referencia la concentración de calcio que se adiciona al medio. Como esta concentración es de 400 μM , el indicador adecuado según el inciso g), es el muréxido ya que su $K_D = 1-3$ mM. En

cuanto a sus demás propiedades, el muréxido cumple con los requisitos establecidos con anterioridad.

B. SELECCION DE LAS LONGITUDES DE ONDA ADECUADAS.

Para ello se obtuvieron los siguientes espectros diferenciales:

1. Muréxido vs Muréxido + Ca^{2+} (Fig. 4a).
2. Muréxido vs Muréxido + Mg^{2+} (Fig. 4 b).

1. Muestra la diferencia del espectro para muréxido después de que se añadieron distintas concentraciones de Ca^{2+} a la celda de la muestra. La presencia de calcio induce un incremento de absorbencia del muréxido a una $\lambda_{\text{max}} = 475 \text{ nm}$ y un decremento a una $\lambda_{\text{min}} = 547 \text{ nm}$, con un punto isosbético a 509 nm . En principio, los cambios de concentración de calcio se pueden medir como los cambios que sufre el indicador a λ_{max} o λ_{min} . Sin embargo, como ya se había dicho las mediciones de los cambios de absorbencia a una sola λ , son insatisfactorios en presencia de mitocondrias y especialmente durante el transporte de calcio dependiente de energía, ya que los cambios inespecíficos de absorbencia como lo son el "swelling" o la precipitación, pueden ser aún mayores que los debidos a cambios en la concentración de calcio. Como estos cambios inespecíficos aparecen en una amplia área del espectro, pueden ser minimizados o abolidos como ya se había mencionado, con el uso de la técnica

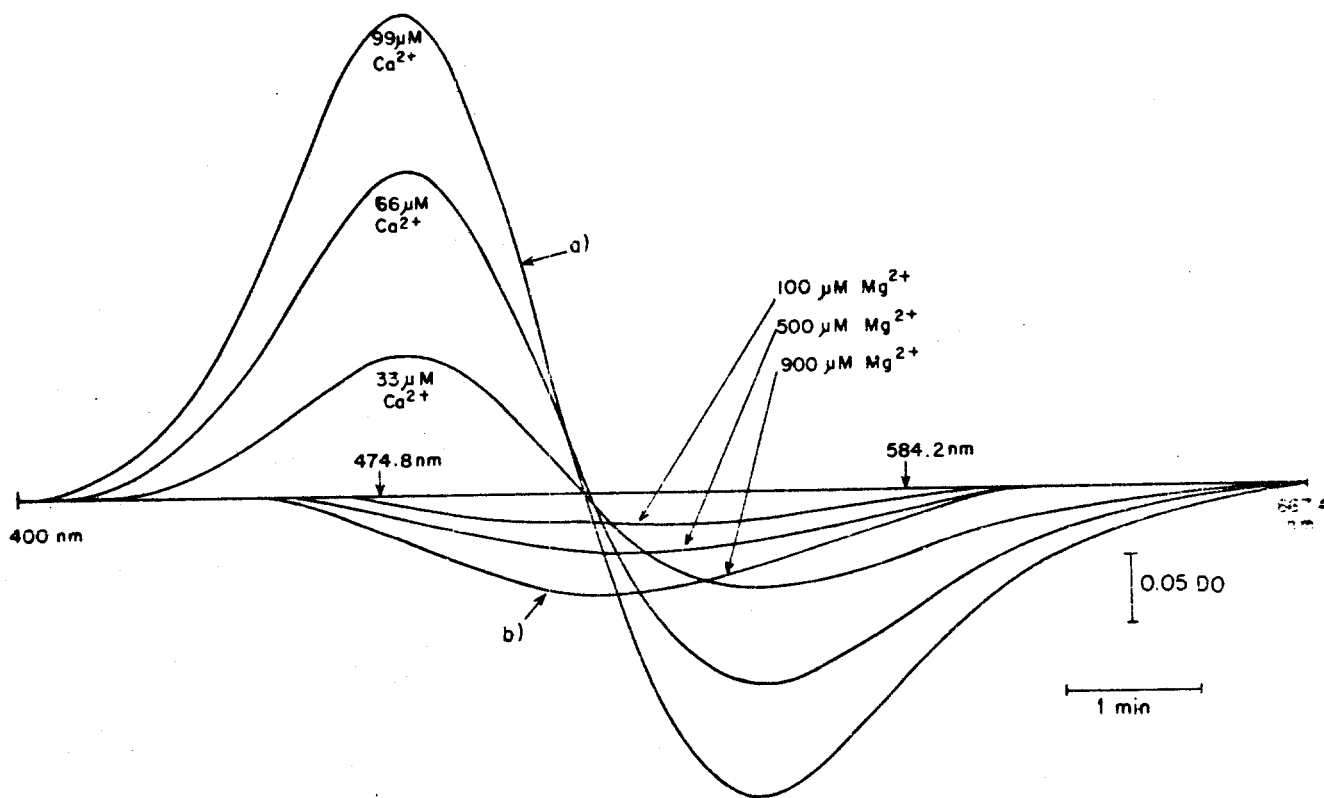


FIG. 4 ESPECTROS DIFERENCIALES MUREXIDO vs MUREXIDO + Ca^{2+}
 El medio de suspensión basal para ambos, fué el mismo que en todos los experimentos; en a) se agregaron distintas concentraciones de Ca^{2+} y en b) se adicionaron diferentes concentraciones de Mg^{2+} .

ca de doble rayo. Con esta técnica los cambios inespecíficos de absorbencia serán iguales en ambas longitudes de onda, dando como resultado un cambio de absorbencia nulo.

2. Muestra el espectro diferencial muréxido vs muréxido + varias concentraciones de Mg^{2+} . La presencia de Mg^{2+} produce un cambio de absorbencia con un pico ancho a $\lambda = 526$ nm. Como se puede observar solo altas concentraciones de este catión, causan un cambio de absorbencia considerable por lo que se ha juzgado que el muréxido es específico para Ca^{2+} . Sin embargo, como precaución se han seleccionado dos longitudes de onda, a las que cuando se mida la absorbencia del muréxido en función del tiempo, solo el Ca^{2+} y no el Mg^{2+} produzca cambios de absorbencia.

Las flechas de la Fig. 4 indican las longitudes de onda seleccionadas: $\lambda_1 = 474.8$ y $\lambda_2 = 584.2$, a las que la absorbencia producida por el Mg^{2+} es la misma, lo que tiene como consecuencia que al aplicar la técnica de doble rayo, la señal para este metal sea nula. En cuanto a la absorbencia generada por la unión del Ca^{2+} al muréxido, a estas longitudes de onda, se observa que a 474.8 hay una absorbencia positiva (+), y a 584.2 una absorbencia negativa (-), al aplicar la técnica de doble rayo, ambas longitudes de onda se restan, lo que daría como resultado una absorción aún mayor. Por lo tanto, con estas longitudes de onda, solo se observará señal en presencia de Ca^{2+} y no de Mg^{2+} , al aplicar el doble rayo.

VII. CONDICIONES QUE SE MANTUVIERON CONSTANTES EN TODOS LOS EXPERIMENTOS.

1. Medio de suspensión basal:
 - 10 mM TEA-Cl (pH 7.4)
 - 15 mM KCl
 - 200 mM Sacarosa-TEA (pH 7.4)
 - 50 μ M Muréxido
 - 1.5 mg proteína/ml
2. Volúmen de la celda = 3 ml.
3. Temperatura ambiente.
4. Mitocondrias depletadas de Pi endógeno.
5. Todas las mediciones fueron realizadas considerando parámetros cinéticos, obtenidos por la técnica de doble rayo usando las longitudes de onda $\lambda_1 = 474.8$ nm y $\lambda_2 = 584.2$ nm.
6. Las reacciones fueron iniciadas con la adición de 400 μ M de CaCl_2 .
7. La solución de muréxido era preparada el mismo día del experimento.

VIII. CALCULOS.

1. La señal correspondiente al transporte de Ca^{2+} para cada experimento se obtiene restándole punto a punto el gráfi-

co que se registra cuando el medio de reacción corresponde exclusivamente al medio de suspensión basal.

2. Al final de cada experimento se realizó una titulación con distintas concentraciones de Ca^{2+} , registrándose los cambios de absorbencia producidos.

3. Los nmoles de Ca^{2+} acumulados para cada experimento, se calcularon para cada punto del registro correspondiente al transporte del catión, en base a la titulación final del mismo.

4. $200 \mu\text{M Ca}^{2+} = 110 \text{ nmoles Ca}^{2+}/\text{mg proteína}$.

5. Cada experimento se realizó por lo menos por triplicado.

6. Las figuras muestran el promedio de los experimentos realizados.

RESULTADOS

El análisis de los cambios en la concentración intra-extra mitocondrial de calcio, debidos a la presencia simultánea de Pi, nigericina y β -hidroxibutirato (1), se realizó de la siguiente manera:

- I. La cinética del proceso.
- II. La especificidad del sustrato.
- III. La especificidad aniónica.
- IV. Efecto de la N-etilmaleimida.
- V. Efecto del β -hidroxibutirato como anión.
- VI. Efecto de la concentración de nigericina.

I. LA CINÉTICA DEL PROCESO.

En la *Fíg. 5* se muestra la cinética del fenómeno y se corrobora que efectivamente a una concentración de $0.14 \times 10^{-6}M$, la nigericina (en condiciones en las que selectivamente excluye K^+ y mete H^+ a la mitocondria) en presencia de Pi y β -hidroxibutirato, promueve la acumulación de Ca^{2+} la cual en cambio es prácticamente nula cuando solo hay β -hidroxibutirato + Pi en el medio. Sin embargo, analizando el proceso cinético se observa que:

- A. En ausencia de nigericina y de Pi añadidos al medio,

el β -hidroxibutirato causa una discreta acumulación inicial de Ca^{2+} , seguramente asociada a la formación de un ΔpH , descrito por diversos investigadores (51,57). El ΔpH generado, se deriva de la alcalinización de la matriz mitocondrial por el bombeo de protones al exterior, acoplado a la oxidación del sustrato. Por lo tanto, se puede inferir que la entrada inicial de calcio a la mitocondria, no requiere de P_i (91). Una vez que ha ocurrido la entrada rápida de Ca^{2+} , éste empieza a ser reciclado a través de la membrana, por lo que se observa una pendiente de eflujo del catión, la cual se estabiliza una vez que la concentración de Ca^{2+} alcanza el equilibrio (Fig. 5, o)

B. Cuando al medio experimental se agrega fosfato además de β -hidroxibutirato, el primer anión causa una entrada inicial de catión mayor que la que se observa únicamente en presencia del sustrato. Esto posiblemente ocurre debido a que la entrada de H^+ , en simport con el P_i , amortigua el medio alcalino interno existente, que había sido promovido por la respiración. Este efecto buffer a su vez origina que el cambio de pH se vea constreñido y que el $\Delta\Psi$ se mantenga a un nivel en el que ocurre una mayor acumulación del catión. Después de esta entrada inicial, se manifiesta el reciclaje, observándose que el eflujo se acelera notablemente por la presencia de P_i (Fig. 5, Δ)

C. Por último, al añadir nigericina al medio, es evidente que la entrada de calcio inicial no se ve afectada notablemente con respecto a la observada cuando sólo hay P_i y β -hidroxibuti

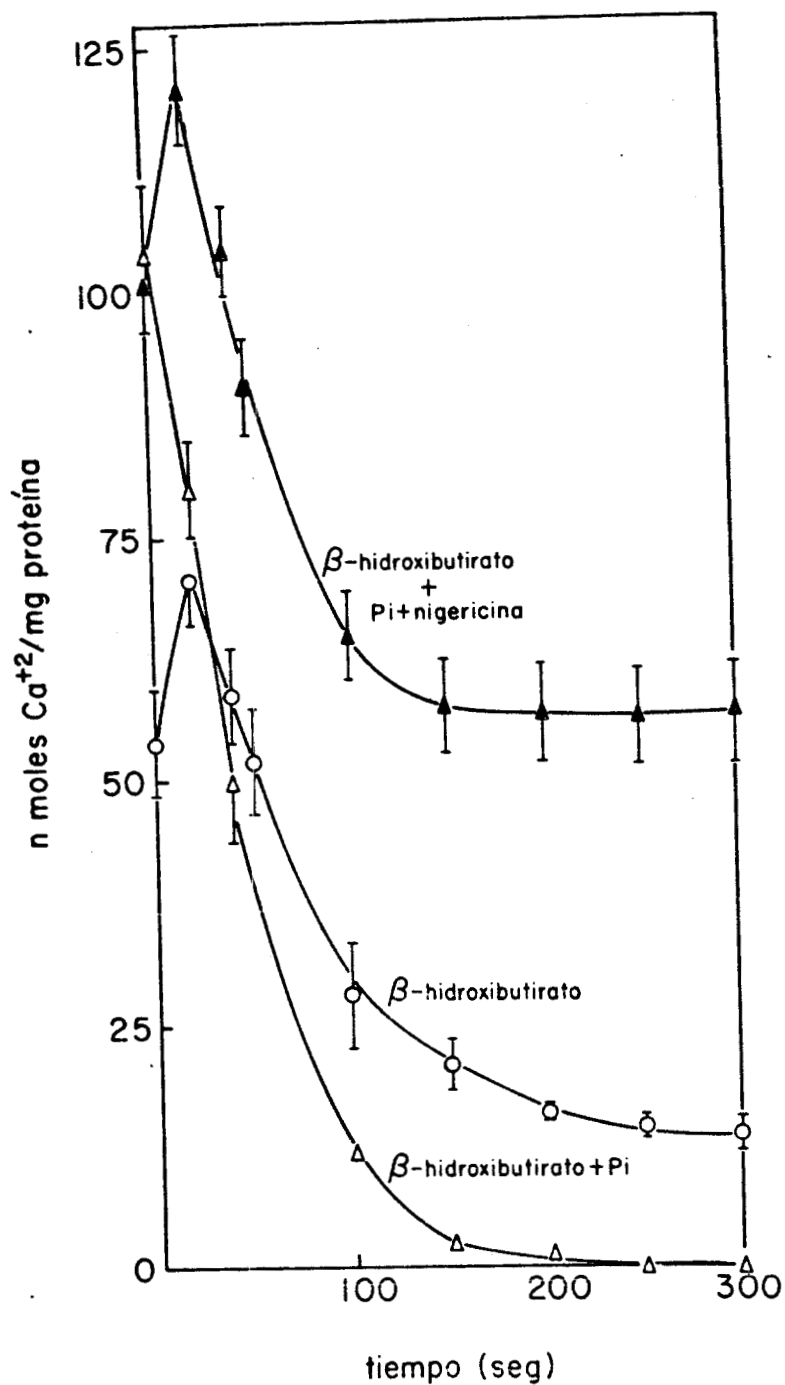


FIG. 5 EFECTO DEL ICNOFORO NIGERICINA Y/O FOSFATO SOBRE EL TRANSPORTE DE Ca^{2+} , EN PRESENCIA DE β -HIDROXI-BUTIRATO. El medio de suspensión basal, es el descrito en "Métodos" + 5mM β -OHButO (TEA) pH 7.4. En (Δ) y (\blacktriangle) el medio contiene además 2.5 mM Pi; y únicamente en (\blacktriangle) el medio tiene 0.14×10^{-6} M de Nigericina. La reacción a temperatura ambiente, se inició al tiempo $t=0$ con la adición de $400 \mu\text{M}$ de CaCl_2 .

rato. Sin embargo, cuando el reciclaje se inicia se observa que la salida del catión disminuye en forma considerable, debido a la presencia del ionóforo (Fig. 5, ▲).

Por lo tanto, el presente experimento demuestra sin lugar a dudas, que la aparente acumulación de Ca^{2+} adjudicada a la nigericina en observaciones previas (1), es debida en realidad a la inhibición del eflujo del ión divalente causado por la nigericina y no como se había pensado, a la aceleración del influjo promovida por el ionóforo.

II. LA ESPECIFICIDAD DEL SUSTRATO.

Al analizar la especificidad del fenómeno con respecto a sustratos que junto con el β -hidroxibutirato, se oxidan en el complejo NADH-Citocromo b (tradicionalmente denominado el sitio 1), como son el glutamato, el piruvato y el par glutamato-malato, se observó que ninguno de ellos -con excepción del β -hidroxibutirato- promovían la inhibición del eflujo del catión, en presencia de nigericina. Además, tampoco permitían la salida rápida de calcio en presencia de Pi, como la que se observó cuando el sustrato era β -hidroxibutirato (Fig. 6A-C).

La entrada inicial de calcio promovida por los tres sustratos señalados fué muy similar, teniendo las siguientes características generales de interpretación: a) en presencia de sustrato solo, la entrada inicial se ve limitada por la formación

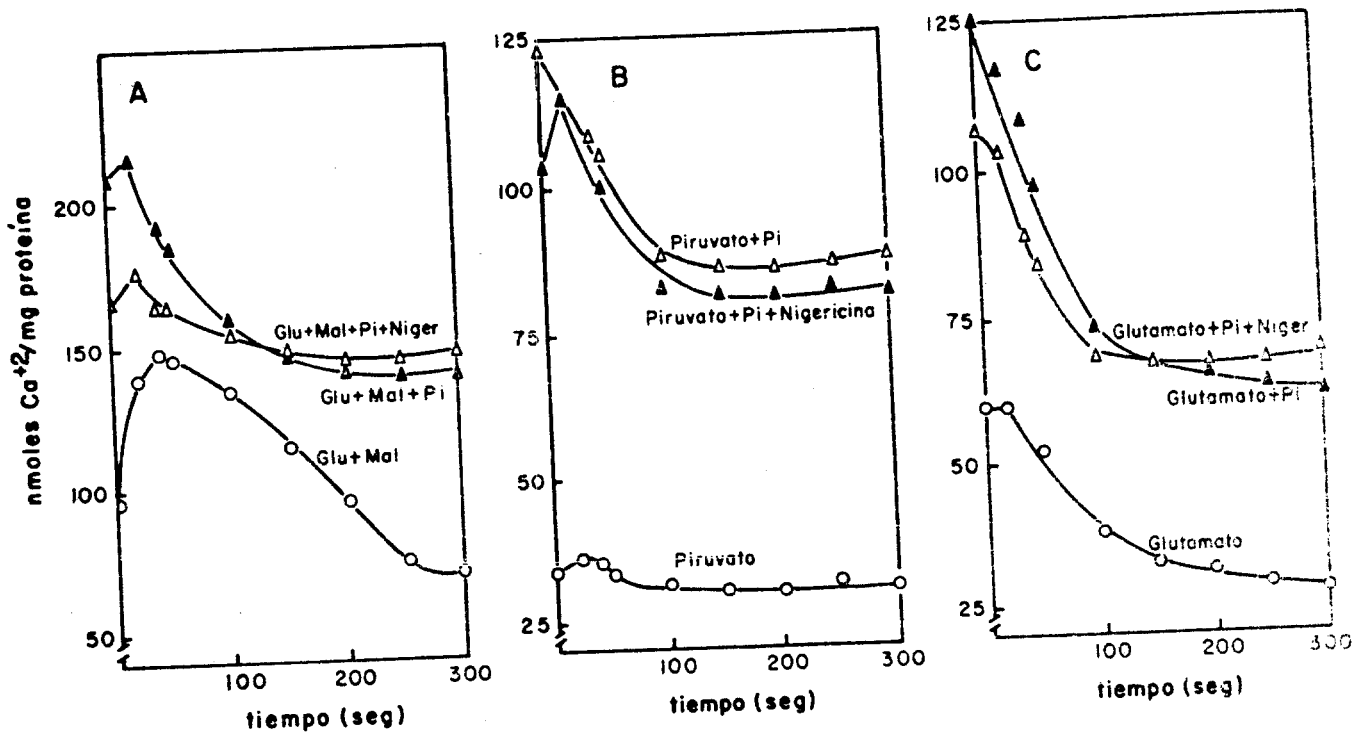


FIG. 6 EFECTO DEL IONOFORO NIGERICINA Y/O FOSFATO SOBRE EL TRANSPORTE DE Ca²⁺, EN PRESENCIA DE: A) GLUTAMATO-MALATO; B) PIRUVATO Y C) GLUTAMATO. El medio de suspensión es idéntico al de la Fig. 5, sólo que en lugar de 5 mM β -OHButO⁻, se agregaron: 2.5mM glutamato, 2.5 mM malato y 2 mM MgCl₂ en A); 5 mM piruvato en B); y 5 mM glutamato en C). La reacción a temperatura ambiente, se inició al tiempo t=0 con la adición de 400 μ M CaCl₂. Las concentraciones de Pi y nigericina que se adicionaron a los medios de reacción correspondientes, fueron las mismas que para la Fig. 5.

del ΔpH generado; b) en cambio, cuando hay Pi en el medio, el abatimiento de este ΔpH promueve una mayor entrada de Ca^{2+} y; c) en los tres casos, se observa que la nigericina disminuye ligeramente la entrada inicial debida al Pi . Posiblemente este último sea un efecto de inhibición similar al presentado cuando el Pi se adiciona en exceso, como se muestra en la *Fig. 10*. Esto es, el exceso de H^+ hace que el ΔpH se colapse y que la entrada electroforética de Ca^{2+} , se inhiba (*Fig. 6 A-C*).

En la *Fig. 7* se presentan los resultados obtenidos cuando el sustrato oxidado (ahora en el complejo Citocromo b-c, también denominado Sitio 2), es el succinato. En esta figura se observa que:

De modo similar a los otros sustratos estudiados, la entrada de calcio debida únicamente a la oxidación del sustrato, es menor que la que ocurre en presencia de sustrato y Pi . Asimismo, la nigericina provoca que la entrada debida a succinato + Pi se vea ligeramente inhibida.

Con respecto a la fase de eflujo se encontró que el succinato no la promueve y que tampoco, el fosfato ni la nigericina la facilitan. Este dato estaría en aparente contraposición con la topología de los resultados obtenidos en vesículas invertidas en los que la entrada y no el eflujo de Ca^{2+} a ellas ocurre con succinato + ATP + Pi (98). En seguimiento simple a esta observación, debería haberse obtenido un marcado eflujo de Ca^{2+} con succinato + fosfato. Sin embargo, puede argumentarse que, en nuestro caso, en el que se trabaja con mitocondrias intactas, la presencia de ATP ,

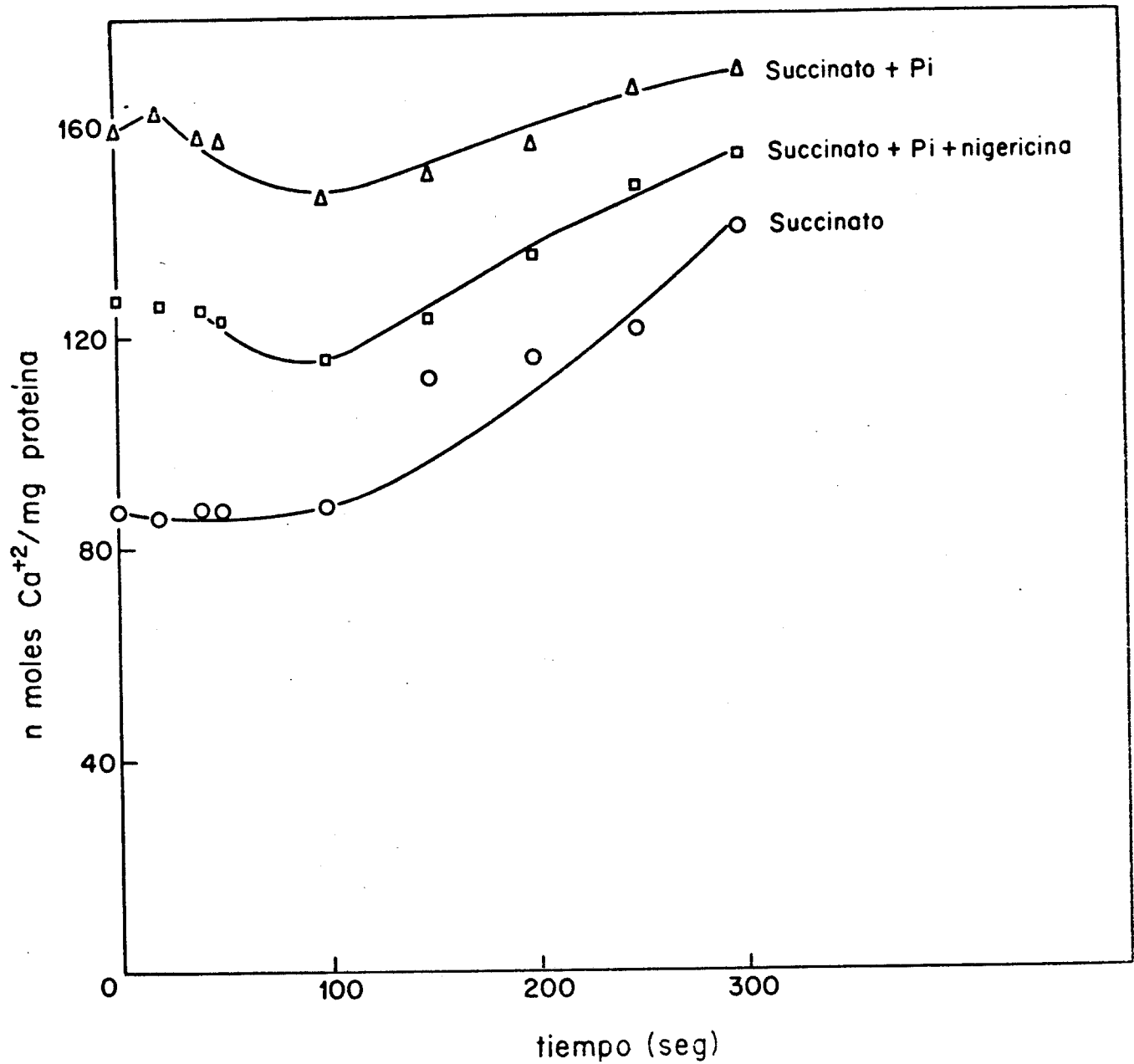


FIG. 7 EFECTO DEL IONOFORO NIGERICINA Y/O FOSFATO SOBRE EL TRANSPORTE DE Ca^{2+} , EN PRESENCIA DE SUCCINATO. El medio de suspensión es idéntico al de la Fig. 5, sólo que en lugar de 5 mM $\beta\text{-OHButO}^-$, se agregaron 5 mM succinato y 2.5 μM rotenona. Las concentraciones de Pi en (Δ) y (\square), la de nigericina en (\square), la temperatura y la concentración de CaCl_2 con la que se inició la reacción, fueron idénticas que en la Fig. 5.

Pi y succinato en el interior de la mitocondria, sea un factor importante para la retención no específica del catión divalente (56), tal y como sucede en el caso de las vesículas invertidas (99) y no que necesariamente el control específico de influjo vs. eflujo requiera de estos componentes. En nuestros experimentos, es de esperarse que el contenido de ATP intramitocondrial sea relativamente alto ya que la depleción de Pi endógeno ocurre a expensas de su esterificación con ADP añadido. Entonces, como el ATP está presente en una proporción similar de concentración en todas las preparaciones ensayadas y el Pi es también un factor constante, es plausible pensar que las variaciones encontradas en la retención del catión sean exclusivamente dependientes del tipo de sustrato utilizado.

El estudio con ascorbato, sustrato que se oxida en el segmento Citocromo a_1 - a_3 (denominado sitio 3), dió como resultado las observaciones que se presentan en la *Fíg. 8*:

La entrada inicial de Ca^{2+} en presencia únicamente del sustrato, la cual refleja una pendiente hiperbólica clara, solamente parece estar limitada por la formación de un ΔpH ; la presencia adicional de Pi en el medio, amortiguaría el ΔpH generado, permitiendo una mayor acumulación de calcio (*Fíg. 8, o*). Por otro lado, la nigericina disminuye ligeramente la magnitud de la acumulación (*Fíg. 8, ●*). Asimismo, y en forma similar a la observada con el succinato, no se observó eflujo del catión en presencia de ascorbato + TMPD y fosfato + nigericina.

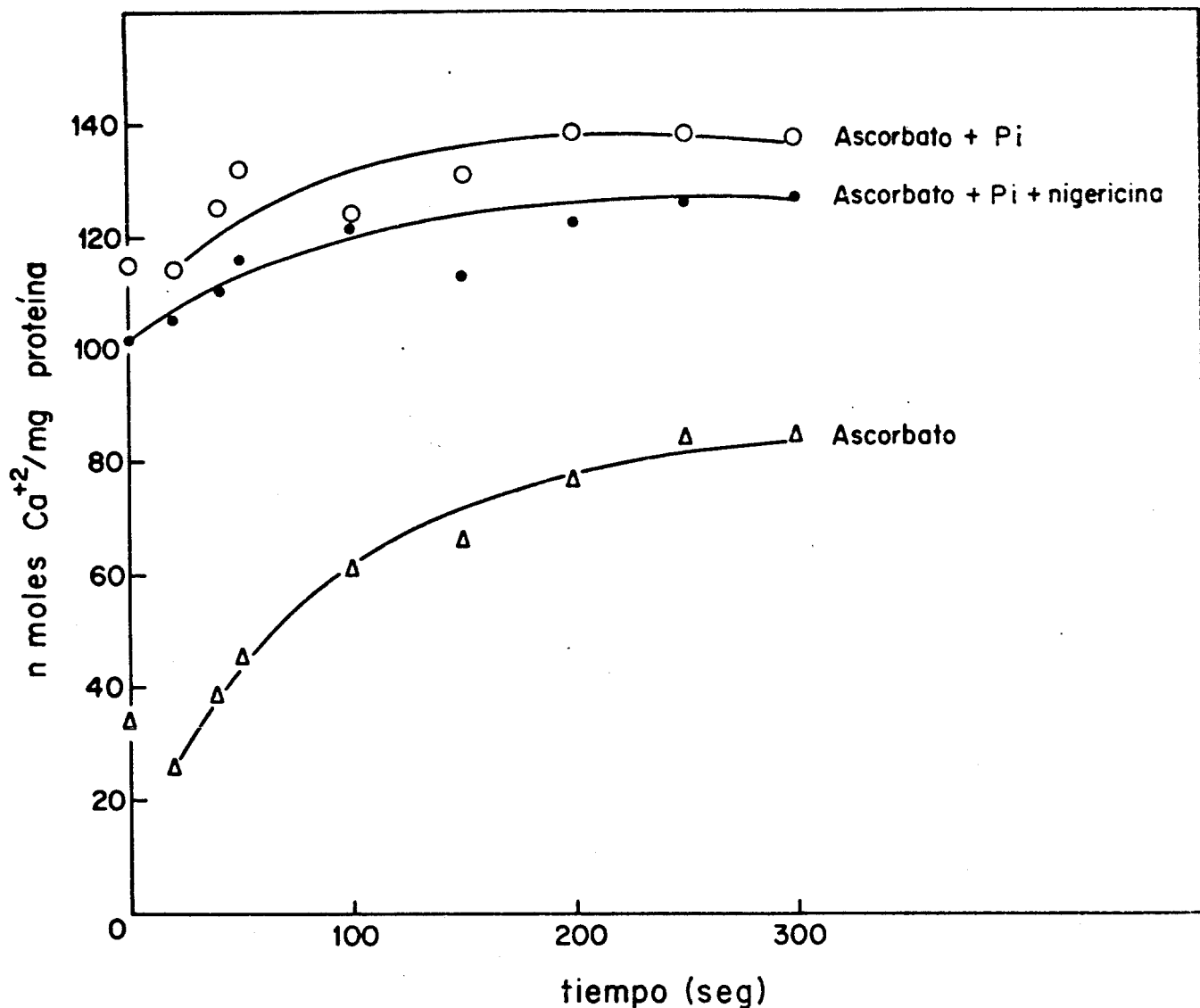


FIG. 8 EFECTO DEL IONOFORO NIGERICINA Y/O FOSFATO SOBRE EL TRANSPORTE DE Ca^{2+} , EN PRESENCIA DE ASCORBATO. El medio de suspensión es idéntico al de la Fig 5, pero en lugar de $\beta\text{-OHButO}^-$, el medio contiene además 5 mM ascorbato, 4.2 μM TMPD (dicloruro de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamonio) y 1.8 μM antimicina A. Las concentraciones de Pi en (O) y (•), la de nigericina en (•), la temperatura y la concentración de CaCl_2 con la que se inició la reacción, fueron idénticas que en la Fig. 5.

Por lo tanto, puede concluirse que la inhibición del eflujo de Ca^{2+} mediado por la nigericina y su correspondiente aceleración promovida por el Pi, sólo ocurren de modo muy específico cuando el sustrato oxidado es el β -hidroxibutirato.

III. LA ESPECIFICIDAD ANIONICA.

Una vez encontrada la especificidad del fenómeno descrito, en relación con la variedad del sustrato oxidado, se decidió analizar si el proceso se repetía en presencia de aniones similares al Pi. Esto es, aniones que al entrar a la mitocondria cotransportan H^+ , o bien, aniones permeantes de carga no localizada que penetran a mitocondrias con metabolismo inhibido (82,92), pero no lo hacen en mitocondrias metabólicamente activas que respiran en presencia de calcio, como lo es el SCN^- .

El resultado típico de este estudio, se muestra en la *Fíg. 9*. En ella destaca el hecho de que el anión acetato no sustituye el efecto del Pi, ya que no se produce un eflujo significativo del catión en presencia del acetato (*Fíg. 9, o*); ni la nigericina previene la discreta salida de Ca^{2+} observada (*Fíg. 9, Δ*).

En la siguiente figura (*Fíg. 10*), se muestra el resultado del estudio llevado a cabo con distintas concentraciones de diferentes aniones, sobrepuesto al efecto mediado por β -hidroxibutirato, Pi y nigericina, en la relación que poseen en el eflujo de Ca^{2+} . En ella se grafica la relación del eflujo causado por la

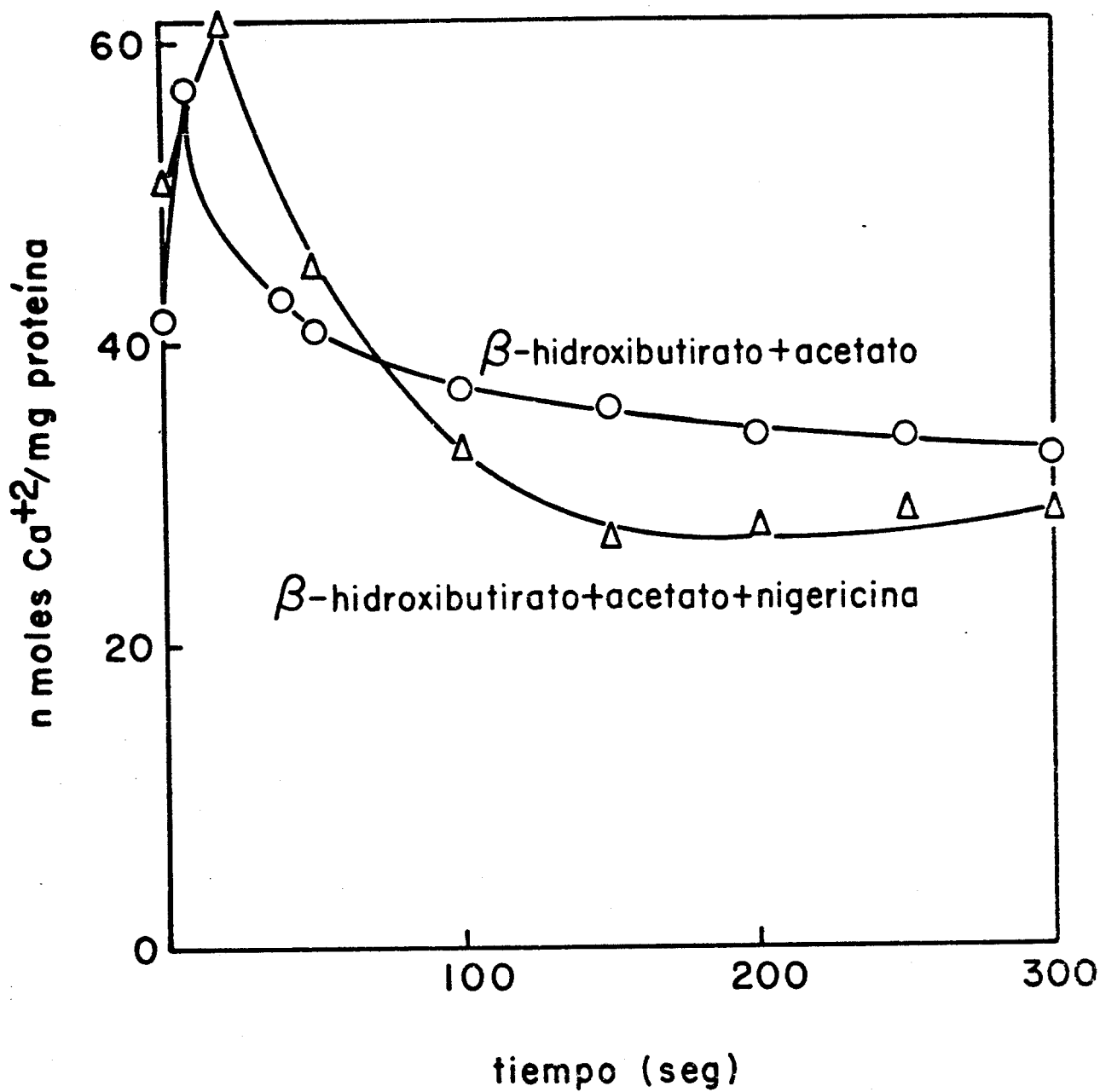


FIG. 9 EFECTO DEL IONOFORO NIGERICINA Y/O ACETATO SOBRE EL TRANSPORTE DE Ca^{2+} , EN PRESENCIA DE β -HIDROXI-BUTIRATO. El medio de suspensión es idéntico al de la Fig. 5, sólo que en lugar de que en (O) y (Δ) haya 2.5 mM Pi , en este caso se tiene 2.5 mM de AcO^- . La concentración de nigericina en (Δ), la temperatura y la concentración de CaCl_2 con la que se inició la reacción son iguales que en la Fig. 5.

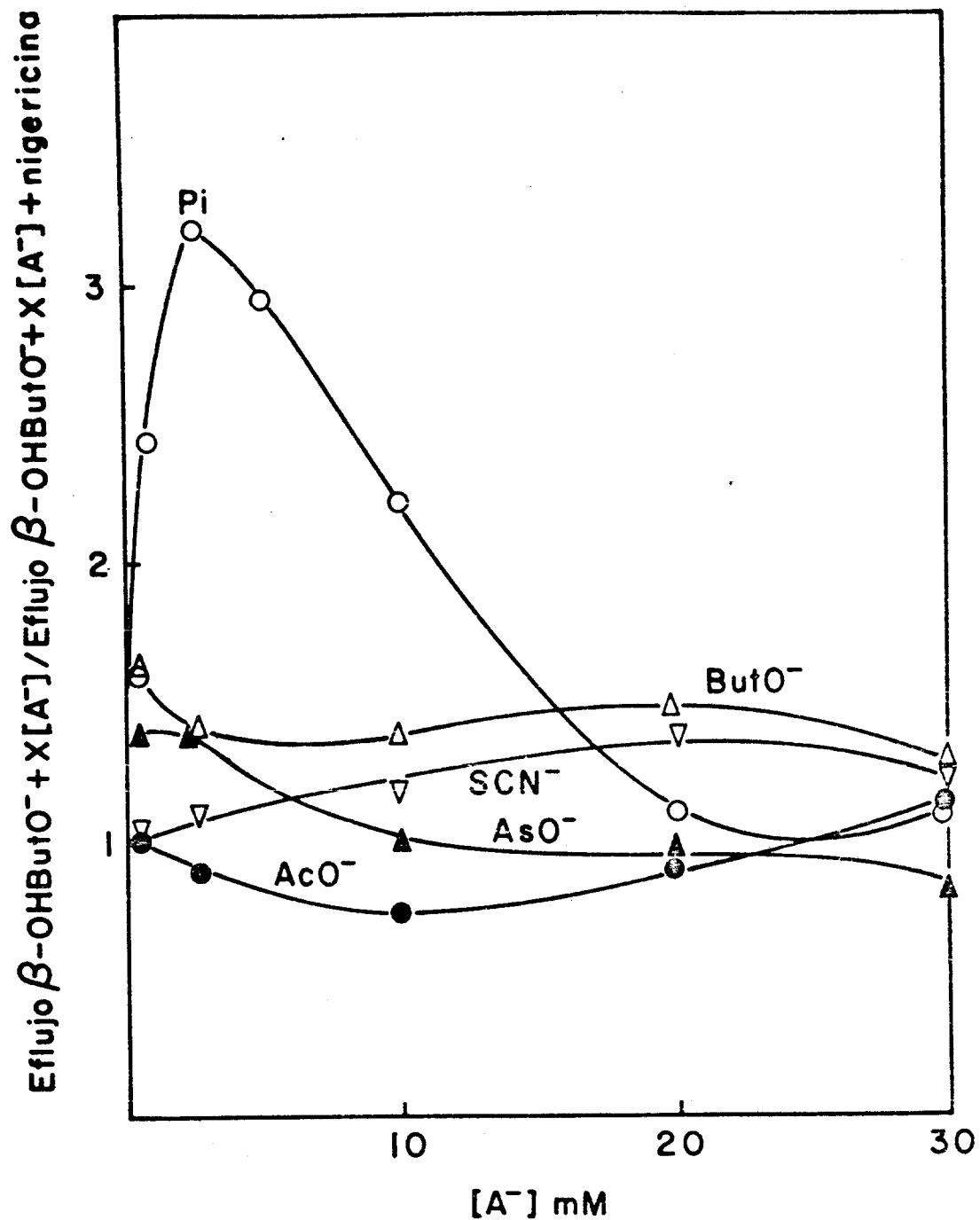


FIG. 10

ESPECIFICIDAD ANIONICA. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE DIFERENTES ANIONES SOBRE LA RELACION: EFLUJO β -HIDROXIBUTIRATO + X $[A^-]$ / EFLUJO β -HIDROXIBUTIRATO + X $[A^-]$ + NIGERICINA. El medio de suspension es idéntico al de la Fig. 5, sólo que se adicionó al medio la concentración de anión, como se indica en la figura (0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 y 30.0 mM). La temperatura y las concentraciones de β -hidroxibutirato, nigericina y $CaCl_2$, son iguales que en la Fig. 5.

presencia del β -hidroxibutirato + Anión, con respecto a la obtenida cuando además se encuentra presente la nigericina. La relación obtenida para todos los aniones estudiados, es siempre cercana a 1, a excepción hecha del Pi, lo cual indica que el eflujo causado por anión, en ningún caso es prevenido por la nigericina, sino que se mantiene en un nivel relativamente constante. Por el contrario, la relación experimental obtenida para el Pi a determinadas concentraciones es mayor que 1, presentando un máximo a 2.5 mM Pi y disminuyendo conforme la concentración de Pi aumenta, hasta mantenerse en un valor aproximado de 1.

Con este experimento queda demostrada la especificidad del fosfato inorgánico, en el proceso de eflujo de Ca^{2+} causado específicamente por β -hidroxibutirato e inhibido también selectivamente por la nigericina.

074824

IV. EFEECTO DE LA N-ETILMALEIMIDA.

Posteriormente se analizó el efecto que en los flujos de Ca^{2+} pudiera tener la N-etilmaleimida, un inhibidor del simporter Pi/H^+ (125). Sorprendentemente, se observa que la entrada de calcio en presencia de β -hidroxibutirato y Pi, no se ve disminuida por la presencia del inhibidor. Este hecho, a su vez, se ve apoyado por la hipótesis de que existe un influjo de Ca^{2+} y Pi no dependientes de NEM (44). Sin embargo, la salida del cación divalente sí se ve sensiblemente afectada por el inhibidor, mismo que provoca una disminución del eflujo de Ca^{2+} promovido por Pi (Fig.

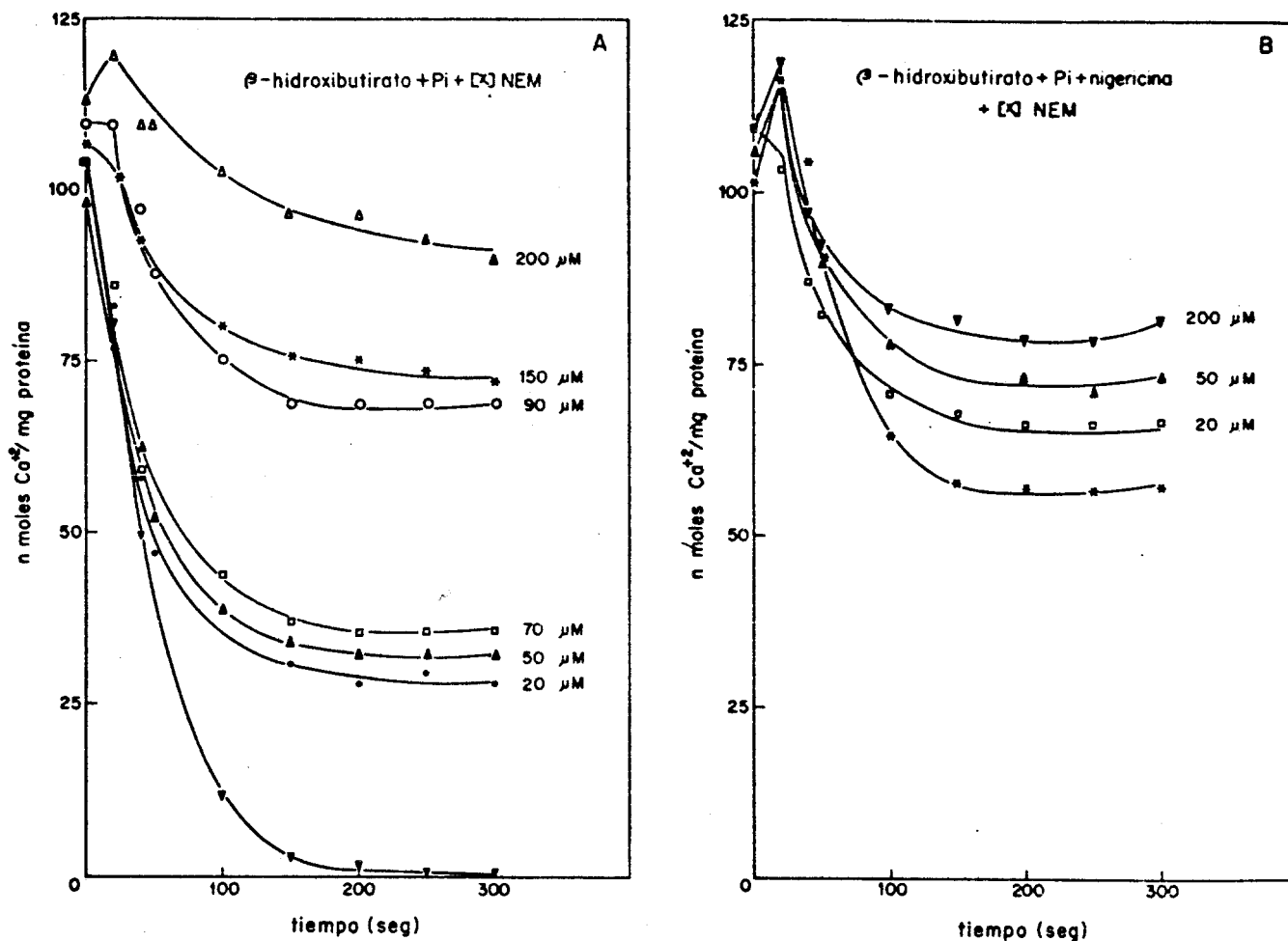


FIG. 11 EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE N-ETIL-MALEIMIDA (NEM), SOBRE LA CINETICA DEL TRANSPORTE DE CALCIO, EN PRESENCIA DE β -HIDROXIBUTIRATO. El medio de suspensión basal, es el descrito en "Métodos" + 5 mM β -OHButO⁻ + 2.5 mM Pi (TEA) pH 7.4 + NEM (la concentración que se indica en la figura), en A y B; y únicamente en B, el medio contiene además 0.14×10^{-5} M de nigericina. La temperatura de reacción y la concentración de CaCl₂ con que se inició la reacción son idénticos que en la Fig. 5.

11 A). Asimismo, la inhibición del eflujo causada por la presencia de nigericina se acentúa notablemente con la NEM (Fig. 11 B).

Por lo tanto, al graficar la relación del eflujo causado por la presencia de β -hidroxibutirato, Pi y NEM con respecto al eflujo observado con β -hidroxibutirato, Pi, nigericina y NEM vs. distintas concentraciones de NEM, se observa una disminución de la relación hasta llegar a un valor aproximado de 1. En otras palabras, es evidente que, a mayor concentración de NEM, el eflujo causado por el Pi se hace muy similar al observado en presencia de fosfato y nigericina (Fig. 12).

V. EFEECTO DEL β -HIDROXIBUTIRATO COMO ANION.

Existía la posibilidad de que la especificidad del β -hidroxibutirato en los flujos de Ca^{2+} , se debiera al efecto que este sustrato pudiera tener exclusivamente como anión (45,95); por lo anterior, se decidió verificar esta posibilidad, inhibiendo su oxidación con rotenona y usando como generador del potencial Δp , al succinato.

Comparando los resultados obtenidos en presencia únicamente de succinato como agente reductor de la respiración (Fig. 7), con los encontrados cuando se adiciona además β -hidroxibutirato como anión (Fig. 13), se observa que:

A. En presencia del anión β -hidroxibutirato (Fig. 13), la oxidación del succinato promueve una entrada inicial de Ca^{2+} que

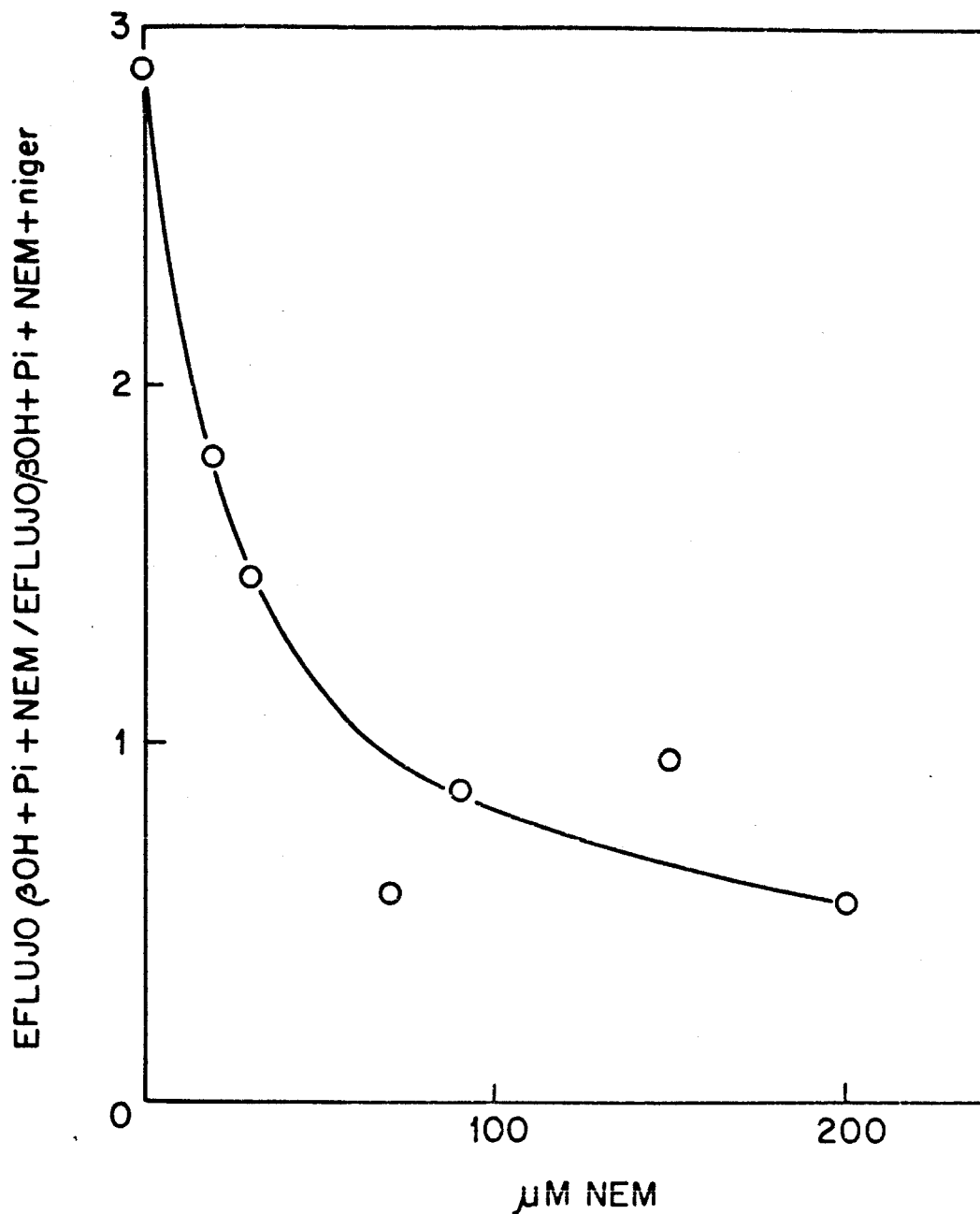


FIG. 12 EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE N-ETIL-MALEIMIDA, SOBRE LA RELACION: EFLUJO 3-HIDROXI-BUTIRATO + Pi + X {NEM}/EFLUJO 3-HIDROXIBUTIRATO + Pi + X{NEM} + NIGERICINA. El medio de suspensión es igual al de la Fig. 5, pero además contiene la concentración de NEM indicada en la figura (20, 50, 70, 90, 150 y 200 μM, respectivamente). La concentración de Pi y nigericina, la temperatura y la concentración de CaCl₂ con que se inició la reacción, son iguales que en la Fig. 5.

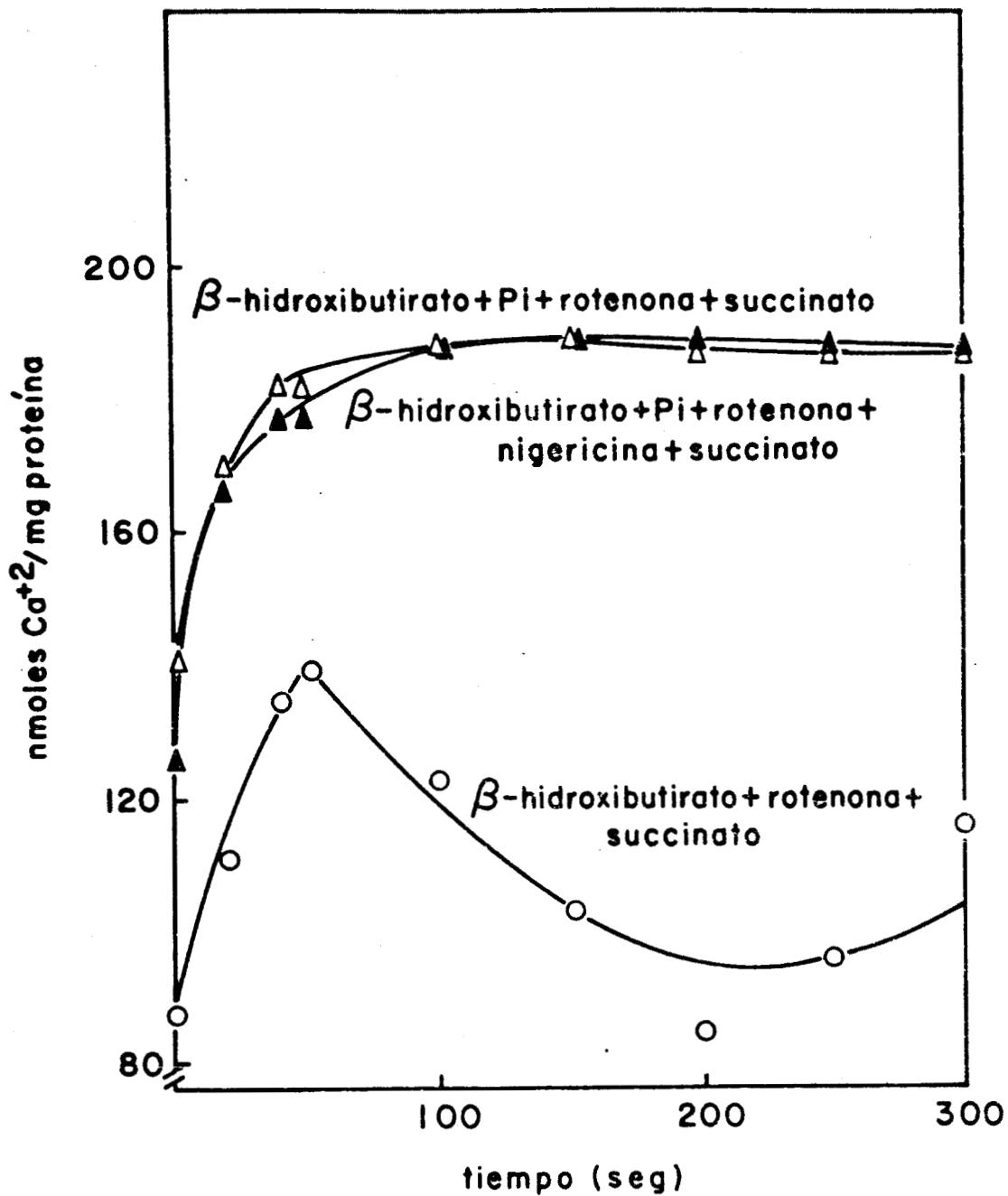


FIG. 13 EFECTO DEL ANION β -HIDROXIBUTIRATO, SOBRE EL TRANSPORTE DE Ca^{2+} . El medio de reacción fue idéntico que en la Fig. 5, pero además de 5 mM β -hidroxibutirato, se agregaron 5 mM succinato y 2.5 μM de rotenona. Las concentraciones de Pi en (Δ) y en (\blacktriangle), la de nigericina en (\blacktriangle), la temperatura y la concentración de CaCl_2 con la que se inició la reacción fueron idénticas que en la Fig. 5.

alcanza un máximo aproximadamente a los 50 seg de iniciada la reacción, muy similar al que se logra en ausencia del anión alrededor de los 300 seg (Fig. 7, o). Sin embargo, la presencia de este anión parece promover una salida de Ca^{2+} , que comparativamente no ocurre en presencia de succinato sólo. Esto, por un lado, señala que el β -hidroxibutirato no coopera como anión con el succinato a través de un posible cotransporte con H^+ para aumentar la entrada de Ca^{2+} ; por otro, también hace evidente un posible papel, sólo de un caracter parcial, que como anión pudiera tener el β -hidroxibutirato sobre el eflujo del catión divalente. Lo anterior nos presenta una nueva perspectiva de análisis sobre trabajos publicados con anterioridad (45,95), en los que se habló de la existencia de un posible cotransporte del anión β -hidroxibutirato con Ca^{2+} , pero en los que no se toma en consideración la participación del mismo en cuanto a las distintas fases del fenómeno de transporte de calcio, es decir, el influjo y el eflujo de éste.

B. Cuando además del anión β -hidroxibutirato no oxidable, el medio contiene Pi , ya sea en presencia o ausencia de nigericina (Fig. 13, \blacktriangle y Δ), la oxidación del succinato y la presencia de aquellos promueven una entrada inicial de calcio que alcanza su máximo a un nivel mayor que el encontrado previamente con el anión β -hidroxibutirato y el succinato solos. Este comportamiento es muy parecido al observado en la Fig 7, Δ y \square , y se explica fácilmente considerando que el Pi presente permite la desaparición, aún parcial, del ΔpH generado por la oxidación del succinato y como consecuencia una mayor acumulación de Ca^{2+} . Asimismo, se encuentra que en

en estas condiciones (Fig. 13, \blacktriangle y \triangle) no se percibe eflujo alguno de calcio como en la Fig. 7, \triangle y \square , lo que nos sugiere que el Pi necesariamente requiere de la oxidación y no sólo de la presencia física del anión β -hidroxibutirato para promover eflujo de Ca^{2+} ; en las circunstancias del presente experimento, el Pi es un factor importante para la retención de calcio en la mitocondria, como ya ha sido sugerido (99) como resultado de un estudio en vesículas invertidas.

Con estos resultados se puede concluir que el efecto del β -hidroxibutirato en presencia de fosfato, es específico sobre el eflujo de calcio y se debe primariamente a su oxidación y no a su transporte como anión protonado.

VI. EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE NIGERICINA.

Se sabe que en las condiciones de pH, concentración de K^+ externa y concentración de nigericina, que fueron utilizadas, ésta última promueve un intercambio eléctricamente silencioso en el que expulsa K^+ e incorpora H^+ a la mitocondria (40). Sin embargo, cuando la concentración de nigericina aumenta se ha observado que tiene acción desacoplante debida a la formación de un dímero que transporta carga neta, al translocar K^+ (126). Por lo tanto, se decidió estudiar el efecto de la concentración de nigericina sobre el cociente del eflujo en presencia de β -hidroxibutirato y Pi, con respecto al observado en presencia de β -hidroxibutirato, Pi y nigericina. Se encontró que esta relación tiene un máximo cuando la nigericina está a una concentración de $1.38 \times 10^{-6}\text{M}$ y que

ésta disminuye a medida que la concentración del ionóforo aumenta. Esto nos ratifica la suposición de que el efecto causado por la nigericina en presencia de β -hidroxibutirato y fosfato se debe a su acción como translocador electroneutro K^+/H^+ , y por supuesto, que en él no participa la acción de la nigericina como translocador de carga neta, abatiendo el $\Delta\Psi$ negativo del interior de la mitocondria (Fig. 14).

En resumen, los resultados experimentales nos muestran que la inhibición del eflujo de calcio causado por el ionóforo nigericina, así como la correspondiente estimulación del mismo, mediado por el fosfato, son fenómenos específicos dependientes ambos de la oxidación del β -hidroxibutirato. También se demuestra que la nigericina tiene este efecto cuando funciona como antiport electroneutro y a su vez, que la NEM parece ejercer su acción específicamente en el eflujo de Ca^{2+} al interferir con el transporte del anión fosfato a través de la membrana.

A continuación se hará un análisis de los resultados con el propósito de lograr el objetivo previamente planteado en la Introducción de este trabajo.

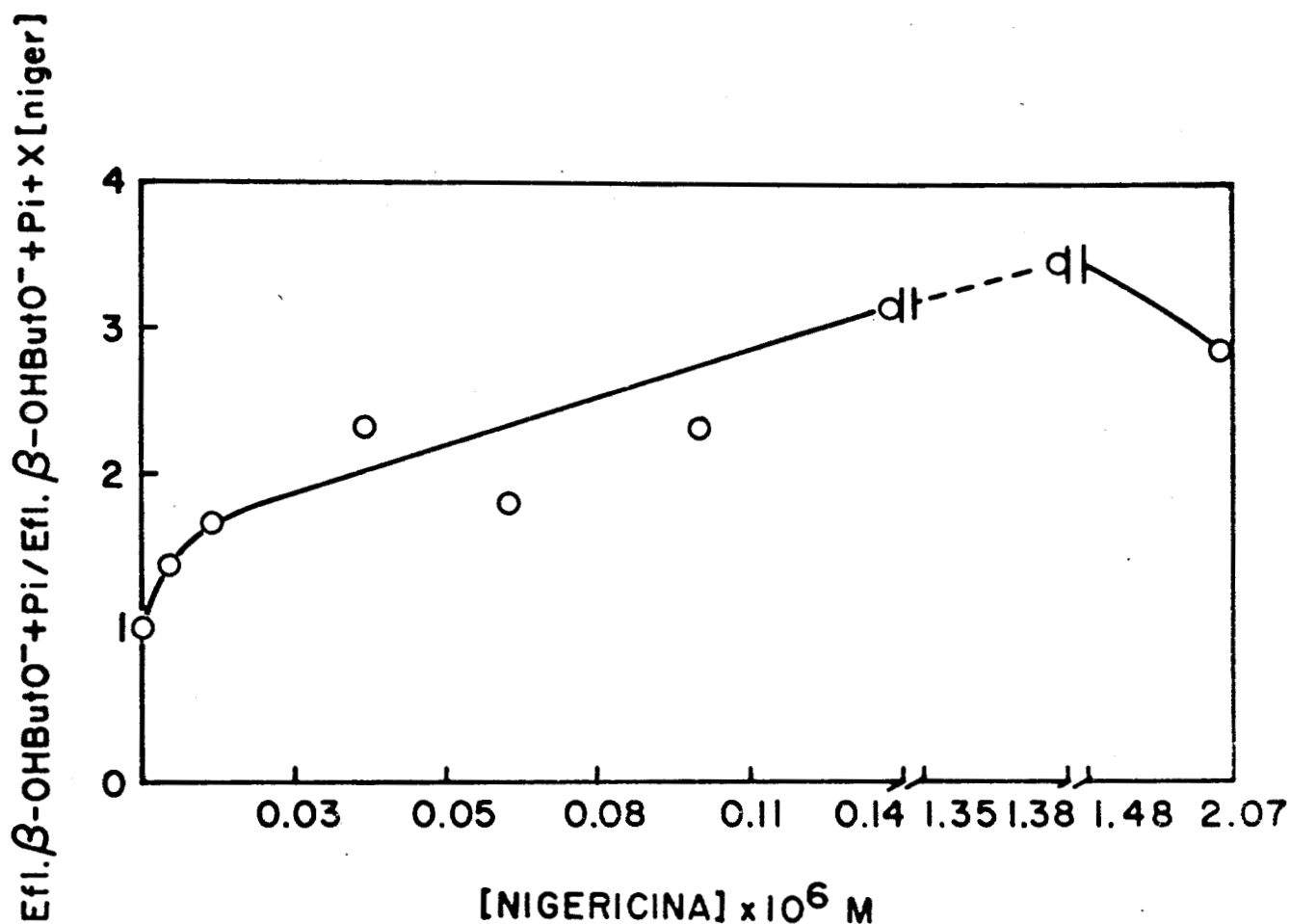


FIG. 14 EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL IONOFORO NIGERICINA SOBRE LA RELACION: EFLUJO β-HIDROXIBUTIRATO + P_i / EFLUJO β-HIDROXIBUTIRATO + P_i + X (NIGERICINA). El medio de suspensión es el mismo que el de la Fig. 5, inclusive las concentraciones de P_i y β-hidroxitirato agregadas. La concentración de nigericina varió como se señala en la figura (1.38, 6.9, 13.8, 41.4, 69.0 x 10⁻⁹M; 0.1, 0.14, 1.38, 2.07 x 10⁻⁶M). La temperatura y la concentración de CaCl₂ con la que se inició la reacción, fueron como en la Fig. 5.

D I S C U S I O N

En esta sección se intenta integrar en lo general los resultados, ya analizados previamente en lo particular, con el fin de poder dar una explicación coherente a los hallazgos experimentales.

I. EL CALCIO RECICLA A TRAVES DE LA MEMBRANA. EL $\Delta\Psi$ REGULA SU INFLUJO Y EL ΔpH DIRECTA O INDIRECTAMENTE EL EFLUJO.

En la presente tesis se estudió la cinética del transporte de calcio en mitocondrias de hígado de rata, bajo condiciones de depleción de fosfato. Estas condiciones de estudio fueron propicias para el análisis de la participación de los componentes $\Delta\Psi$ y $Z \Delta\text{pH}$ del potencial protón-motriz, sobre el proceso de reciclaje de calcio. Así tenemos que en las *Figuras 5-9, 11 y 13*, se observa claramente el fenómeno de transporte de calcio, su reciclamiento y su regulación por distintos factores ya sea específicos o no específicos.

En relación a la participación de los componentes del potencial protón-motriz, sobre la fase de influjo, se puede deducir tanto de las *Figuras 5-9, 11 y 13*, como de múltiples reportes de la

literatura (30,82,90,91), que la entrada inicial de calcio se efectúa gracias al $\Delta\Psi$ generado en la respiración. Esto sin que se requiera primariamente de algún agente que modifique el ΔpH formado, para que el proceso de entrada del catión pueda ocurrir; lo que queda, con cierto grado de obviedad confirmado con la ausencia de requerimiento de fosfato para que se lleve a efecto una entrada de Ca^{2+} .

Con respecto al papel que juegan los componentes del potencial protón-motriz en la fase de eflujo, se establece ahora en forma incuestionable que el movimiento de este catión a través de la membrana presenta características específicas cuando el fenómeno se observa en condiciones en las que se encuentra presente el β -hidroxibutirato como sustrato y el P_i como anión. Por otro lado, y como aportación también del presente trabajo se puede concluir que el eflujo del catión parece estar selectivamente regulado, directa o indirectamente por el componente $Z \Delta\text{pH}$ del potencial protón-motriz. Esto se deduce del hecho de que la nigericina, no hace otra cosa que únicamente promover un cambio de ΔpH -al intercambiar K^+/H^+ en un proceso eléctricamente silencioso (40)-, en paralelo a prevenir el eflujo del catión divalente regulando entonces su salida al modificar el ΔpH . Asimismo, el papel del $Z \Delta\text{pH}$ puede ejercerse en el transporte de fosfato, requerido este último entonces como evento indispensable para el eflujo de Ca^{2+} . El hecho de que la nigericina inhiba la acumulación de fosfato en mitocondrias intactas (110), podría explicar también la participación del ΔpH en el eflujo del catión divalente. Otros puntos a favor de las sugerencias señaladas se encuentran en las *Figuras 11 y 14*. La *Fig. 14* indica que es a partir de una concentración de $1.48 \times 10^{-6}\text{M}$, que el efecto de inhibición por parte del ionóforo sobre el eflujo empieza a abatirse. Esto es compatible con el hecho bien conocido de que cuando la concentración

de nigericina aumenta a $>1.48 \times 10^{-6}M$, ésta empieza a formar dímeros conductores de K^+ , lo que implica una translocación de carga neta (126), lo que a su vez reafirma la hipótesis de que el paso del Ca^{2+} de la mitocondria al citoplasma es regulado, directa o indirectamente por la diferencia intra-extramembranal de pH y no por el componente eléctrico del potencial protón-motriz.

Asimismo, la *Fíg. 11*, en la cual se encontró que la NEM inhibe el eflujo de calcio en mitocondrias depletadas parcialmente de Pi endógeno, nos vuelve a indicar que el factor que regula este proceso de eflujo es el ΔpH , ya que como se sabe la NEM inhibe el cotransporte Pi/H^+ , el cual no afecta al componente $\Delta \Psi$, pero si lo hace con el $Z \Delta pH$. Debe señalarse sin embargo, que este último resultado requiere de ser analizado en relación a algunos reportes de la literatura en los que se observa que la NEM favorece la salida de calcio (127,128), en mitocondrias no depletadas de Pi . La explicación a este fenómeno (127) ha sido poco satisfactoria toda vez que se atribuye a un deslocalizado efecto de la NEM sobre el estado energético de la membrana interna mitocondrial.

II. LA β -HIDROXIBUTIRATO DESHIDROGENASA ESTA INTIMAMENTE RELACIONADA CON EL EFLUJO DE Ca^{2+} GENERADO POR LA OXIDACION DEL β -HIDROXIBUTIRATO EN PRESENCIA EXCLUSIVA DE FOSFATO.

Las *Figuras 6-10 y 13*, muestran que tanto el efecto inhibitorio de la nigericina sobre el eflujo de calcio como la acti-

vación de éste por el fosfato, sólo se manifiestan cuando el β -hidroxibutirato está presente como sustrato oxidable. Esto a su vez, nos lleva a pensar que posiblemente la β -hidroxibutirato deshidrogenasa membranal esté actuando simultáneamente como translocador de un ácido carboxílico tanto como enzima oxidativa, en asociación directa con el acarreador de Pi. Esta asociación parece ser topológicamente asimétrica, ya que la NEM inhibe la fase de eflujo y no así la de influjo, lo cual a su vez nos lleva a considerar que el proceso de influjo, el aumento en el transporte de calcio con fosfato, no es debido principalmente a la entrada de Pi/H^+ , como lo han sugerido otros autores (44). Aún más, puede ser razonable pensar que el producto de oxidación del β -hidroxibutirato, el acetoacetato, tenga un papel importante en el proceso; ésto se infiere en base a que otros autores han observado que en su presencia -de acetoacetato- el eflujo del catión aumenta (100). Los autores señalados, han relacionado al proceso de eflujo con el estado de óxido-reducción de los piridínnucleótidos, quedando en sus propuestas implícito el papel regulador central de la NADH deshidrogenasa. Sin embargo, con los resultados de la *Fig. 6* se puede reconsiderar la hipótesis de Lehninger y col. (100), ya que los sustratos estudiados en esta figura aún cuando modifican del mismo modo el estado de óxido-reducción de los piridínnucleótidos, al oxidarse, no promueven el eflujo de Ca^{2+} , como lo hace el β -hidroxibutirato.

III. LA OXIDACION DEL β -HIDROXIBUTIRATO ES LA QUE FAVORECE LA SALIDA DE Ca^{2+} DE LA MITOCONDRIA AL CITOSOL.

Del análisis de las *Figuras 7 y 13*, se concluye que la oxidación del β -hidroxibutirato juega un papel central en el control del eflujo de Ca^{2+} . Es únicamente cuando este sustrato se oxida, que la adición de Pi causa una salida abrupta de Ca^{2+} , lo cual a su vez no se observa cuando el β -hidroxibutirato esté presente como anión o bien cuando otro sustrato sea el que se oxide. Por otro lado, en la *Fíg. 13 (o)*, se hace evidente que el β -hidroxibutirato tiene un papel parcial como anión en el eflujo de calcio ya que permite su salida cuando la fuente reductora es el succinato, aunque este efecto se vea anulado cuando además el medio tiene Pi, en contraste con el estímulo del eflujo que se encuentra con este último, cuando el β -hidroxibutirato se oxida.

IV. EN EL PROCESO DE RECAMBIO DE CALCIO, LAS FASES DE INFLUJO Y EFLUJO ESTAN REGULADAS DE DISTINTA MANERA.

Se cuenta con una serie de evidencias experimentales que sugieren que los factores que regulan la fase de influjo de calcio son diferentes a los que regulan su salida. Entre algunas de estas evidencias se tienen las siguientes: a) inhibición selectiva de las distintas fases, por ejemplo, el rojo de rutenio inhibe al influjo y no al eflujo (76,78), o bien la nupercaína que sólo previene la salida del catión sin modificar su ingreso (129); b) ambos procesos siguen un patrón de inhibición diferente con la serie de los lantánidos, es decir, el eflujo es mucho menos sensi

ble a ellos, siendo además su patrón de potencial inhibitorio opuesto al que corresponde al influjo (130); c) la entrada de calcio se ve favorecida por ADP y ATP, siendo ésta inhibida por atractilósido (68), por el contrario la salida del catión se frena con estos nucleótidos (131) y; d) la exclusión del catión de la mitocondria aumenta con: Na^+ en mitocondrias de algunos tejidos (102), ácidos grasos (103), la oxidación de los piridín-nucleótidos (100) y hormonas tiroideas (106,132), lo que no ocurre con la fase de entrada del mismo a la mitocondria.

Por lo tanto y en base también a los rubros anteriores se deduce que las fases de influjo y eflujo del reciclaje membranar de calcio están reguladas por distintos factores. Por otro lado, parece ser que el influjo está modulado principalmente por el $\Delta\Psi$ del potencial protón-motriz (30,82,90,91), sin embargo, como contribución original de la presente tesis, es evidente que el eflujo está controlado directa o indirectamente por el componente termodinámico $Z \Delta\text{pH}$. También queda demostrado que mientras para el influjo no parece haber distinción de efectos entre los distintos sustratos oxidables estudiados (Figs. 5-8), si existe esta última para la fase de eflujo. Así tenemos que la oxidación del β -hidroxibutirato en presencia de P_i promueve una salida casi total de Ca^{2+} , la cual no se repite con ningún otro sustrato, ya sea de segmento 1, 2 o 3. Además el hecho de que la nigericina modere el eflujo de calcio causado por el β -hidroxibutirato y no

el que se observa con otros sustratos del sitio 1, nos indica que muy probablemente el β -hidroxibutirato juegue un papel importante en la regulación del eflujo del catión divalente, así como al gún sistema natural que haga las veces de la nigericina, i.e., el antiport mitocondrial $\text{Na}^+ > \text{K}^+ / \text{H}^+$. También se demuestra en el presente trabajo que para que el β -hidroxibutirato cause eflujo de calcio, se requiere compulsivamente de Pi (Fig. 5, Δ), lo que no sucede para el proceso de entrada del catión divalente. Por último, se hace aún más evidente el control diferencial entre influjo y eflujo de Ca^{2+} con el resultado de la Fig. 11, la cual indica que el eflujo de Ca^{2+} es abatido por la presencia de NEM, mientras que la penetración del ión al interior de la mitocondria no lo es.

V. DIAGRAMA PROPUESTO PARA EXPLICAR EL CONTROL DEL RECAMBIO DE CALCIO EN LA MEMBRANA MITOCONDRIAL.

En base a la regulación asimétrica del recambio de calcio que se ha observado en el presente trabajo (Figs. 5-13), tanto como a las evidencias ya mencionadas en párrafos anteriores, y a las pruebas experimentales obtenidas por otros autores con estudios de transiciones energéticas (108), el modelo que se propone para representar el sistema de transporte de calcio (Fig. 15), involucra la asociación de un translocador de tipo canal asimétrico para el Ca^{2+} , en paralelo con otros sistemas de transporte para aniones, cationes monovalentes y protones. A con

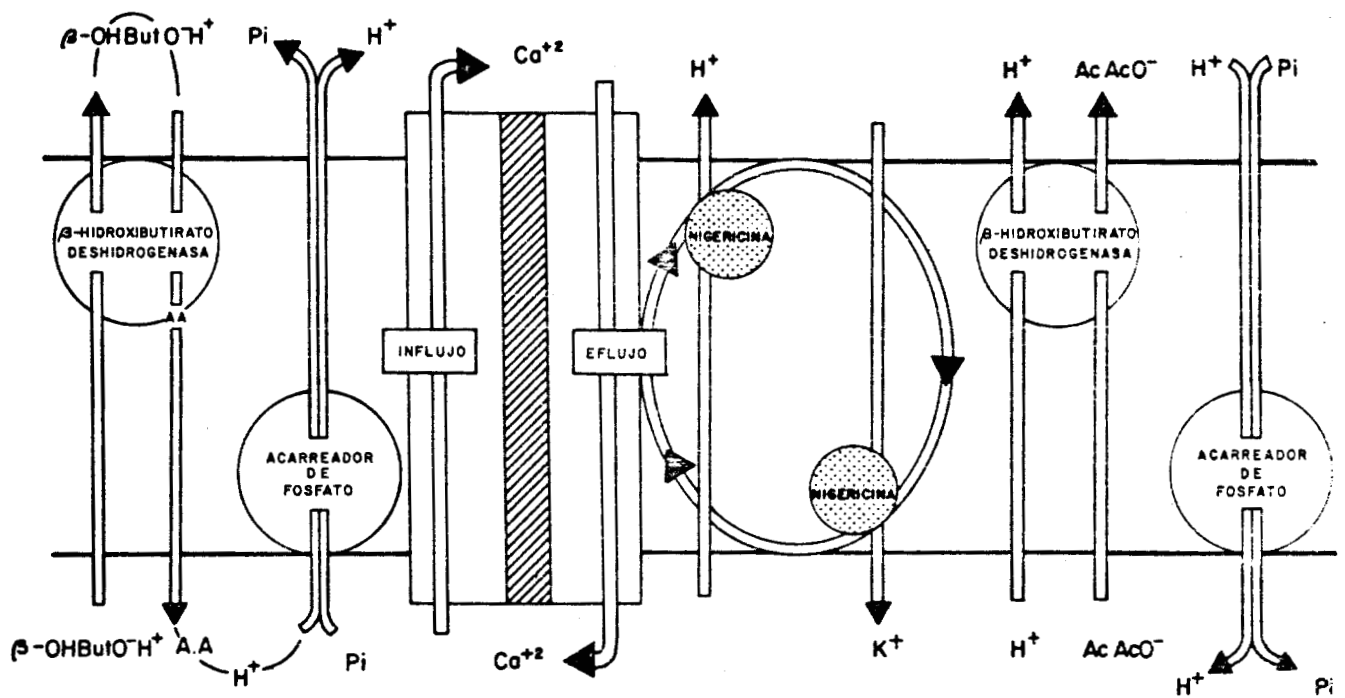


FIG. 15 MODELO MOLECULAR DEL SISTEMA DE TRANSPORTE DE Ca^{2+} .

tinuación se hace una descripción del modelo:

A. FASE DE INFLUJO.

A pesar de que se ha demostrado que el influjo de calcio obedece al $\Delta\Psi$ generado por la oxidación de cualquier sustrato (30,82,90,91), irrespectivo de la estructura de los mismos (Figs. 5-8), se presta atención en este modelo al β -hidroxibutirato ya que al estar involucrado en la regulación del proceso de eflujo, se torna de interés el analizar la manera en que pudiera estar involucrado dentro del proceso total de recambio de calcio. En consecuencia, se puede suponer que el β -hidroxibutirato es co-transportado con H^+ , al interior de la mitocondria (91), posiblemente mediante un componente molecular íntimamente asociado a la deshidrogenasa membranar, la cual a su vez oxida a este sustrato en la cara interna de la mitocondria (133,134).

Posteriormente el producto de oxidación protonado es expulsado al exterior. La generación de la diferencia del potencial eléctrico a través de la membrana, permite una acumulación de calcio limitada. En cambio, cuando hay P_i presente, éste toma el H^+ del acetoacetato, penetra a la mitocondria y amortigua el ΔpH formado, con lo que se promueve una mayor acumulación de calcio. La no inhibición de la NEM sobre esta acumulación del catión, nos lleva a aceptar la existencia de una asociación directa entre un sistema de transporte de fosfato insensible a NEM y la deshidrogenasa.

B. FASE DE EFLUJO.

En relación a la fase de eflujo de calcio, como ya hemos visto es favorecida específicamente por la oxidación de β -hidroxibutirato cuando el symporter Pi/H^+ se encuentra funcionando y por el contrario, se inhibe cuando la actividad de este último se nulifica con NEM, o bien, cuando se incrementa la actividad del antiport C^+/H^+ mediante el uso del ionóforo nigericina. Estos hechos nos llevan a suponer que el producto de oxidación del β -hidroxibutirato, el acetoacetato (AcAcO^-), juega un papel importante favoreciendo el eflujo (100). Se propone en el esquema que esto se pueda deber a la formación de un ΔpH cuando el acetoacetato sea cotransportado con H^+ ; lo que podría también explicar el por qué al salir Ca^{2+} de la mitocondria existe una entrada simultánea de H^+ sin que haya aumento en el consumo de O_2 (100,106). Por otra parte, el hecho de que el eflujo se manifieste cuando el symporter Pi/H^+ se encuentra funcionando, se puede deber a que éste proporciona una fuente mayor de protones que aumenta el ΔpH y por lo tanto la salida del catión; esta suposición se ve apoyada con la inhibición del eflujo del catión con NEM. Finalmente, se pone de manifiesto en este trabajo que en realidad existe una asociación en paralelo entre los sistemas de transporte de calcio, fosfato, β -hidroxibutirato y cationes monovalentes, al encontrarse que la nigericina es capaz de regular el eflujo, en similitud a lo que eventualmente podría ser el papel del antiport mitocondrial $\text{Na}^+ > \text{K}^+/\text{H}^+$.

VI. PAPEL DEL ANTIPOORT C^+/H^+ EN EL TRANSPORTE DE CALCIO.

Como ya se comentó con anterioridad, el hecho de que la nigericina regule el eflujo de Ca^{2+} únicamente cuando éste es causado por β -hidroxibutirato y Pi (Fig. 5, \blacktriangle), da un indicio de que el sistema natural mimetizado por la nigericina, es decir, el antiport $\text{Na}^+ > \text{K}^+ / \text{H}^+$, sea el responsable directo de la regulación de este proceso.

De hecho se ha descrito la resolución y reconstitución en liposomas de dos sistemas de transporte iónico de mitocondria de corazón (135), uno, un antiport $\text{Ca}^{2+} / \text{H}^+$ y otro un antiport Na^+ / H^+ , pero nunca de un acarreador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ como se ha venido proponiendo (101,102). Esto nos indica que efectivamente el antiport que recambia cationes monovalentes por H^+ es el responsable biológico del nivel de Ca^{2+} en la mitocondria y en consecuencia uno de los principales elementos en el control de la concentración extramitocondrial o intracelular del ión calcio. Esto podría a su vez implicar que la selectividad al Na^+ de membranas mitocondriales de corazón pueda quizá relacionarse con el contenido citoplásmico de Ca^{2+} en la célula cardíaca, mientras que la selectividad al K^+ de membrana mitocondrial de hígado de rata relacione lo propio en la célula hepática.

VII. FUNCION BIOLOGICA DEL RECAMBIO DE Ca^{2+} A NIVEL CELULAR.

Aunque el proceso de acumulación de calcio por la mitocondria se ha estudiado desde hace alrededor de 20 años, la apre

ciación del papel crítico que el transporte de calcio mitocondrial tiene en la homeostásis del Ca^{2+} celular y en consecuencia de su papel como activador y regulador de diversos procesos biológicos (136), se está apenas desarrollando. Entre estos procesos se pueden enumerar los siguientes:

1. Activación e inhibición de sistemas enzimáticos, como son: la succínico deshidrogenasa, la piruvato kinasa, la α -glicerofosfato deshidrogenasa y la piruvato deshidrogenasa fosfato fosfatasa (137-140).

2. Activación de sistemas contráctiles como son las mifibrillas de músculos esquelético y liso (141-144).

3. Regulación hormonal, como la liberación de insulina y vasopresina (145-146).

4. Transmisión neuronal, es decir la liberación del neurotransmisor (147-148).

En ellos, el control por parte del ión Ca^{2+} se manifiesta cuando ocurre un cambio en la concentración de calcio citoplásmico, de niveles normales de 10^{-8} - 10^{-7} M, a niveles activados que pueden llegar a alcanzar una concentración de 10^{-5} M.

Por otra parte, se ha encontrado que la mitocondria en ausencia de fosfato, sólo acumula hasta $10 \mu\text{mol Ca}^{2+}/\text{g}$ tejido in vivo, e in vitro únicamente $100 \text{ nmol Ca}^{2+}/\text{mg}$ proteína (57,149); lo cual implica que la práctica totalidad de Ca^{2+} celular no se encuentra en la mitocondria. Esto último ha sido notablemente apoyado a partir de los hallazgos de que las mitocondrias poseen un sistema de transporte responsable del eflujo de calcio y que cual-

quier alteración en la actividad de este sistema da como resultado un cambio en la distribución de Ca^{2+} entre el citosol y la mitocondria (150-151).

Por lo tanto, posiblemente el evento más importante en el recambio de calcio mitocondrial, sea el control de su eflujo dependiente de variaciones en el ΔpH . Asimismo, el hecho de encontrar en este trabajo que el eflujo está crítica y centralmente regulado por la oxidación del β -hidroxibutirato en asociación con el ión fosfato, y que a su vez este eflujo se encuentra bajo el control del antiport C^+/H^+ , abre una nueva perspectiva para la mejor comprensión de este proceso, que le permite al ión Ca^{2+} ejercer su papel regulatorio sobre gran número de reacciones del metabolismo celular.

CONCLUSIONES

Del análisis de los experimentos se concluyen los siguientes puntos:

A. Las fases de influjo y eflujo correspondientes al proceso de recambio de calcio en la membrana mitocondrial cuando el β -hidroxibutirato se oxida están reguladas de distinta manera por los componentes del potencial protón-motriz generado en la respiración. Así el $\Delta\Psi$ regula el influjo y el ΔpH directa o indirectamente el eflujo.

B. El β -hidroxibutirato favorece selectivamente el eflujo de calcio, en presencia del anión fosfato.

C. En relación a la selectividad que el β -hidroxibutirato tiene sobre el eflujo de calcio, señalada en el párrafo anterior, se encontró que ningún otro ácido mono-, di- o tricarbónico lo reemplaza. Este eflujo de Ca^{2+} es debido a su oxidación y no al papel que como anión pudiera ejercer.

D. El fosfato es requerido en el interior de la mitocondria para que exista eflujo de calcio. El ión fosfato no puede ser suplantado por ningún otro anión de los ensayados experimentalmente.

E. Parece existir una relación directa entre la actividad de la β -hidroxibutirato deshidrogenasa y el fenómeno de transporte de Ca^{2+} , particularmente en la fase de eflujo del

mismo.

F. Como la NEM abate al eflujo de Ca^{2+} causado por el β -hidroxibutirato + Pi, y no así a la fase de acceso del catión, se colige una asociación directa entre el cotransporte de Pi, el β -hidroxibutirato y el Ca^{2+} en la entrada del catión; esta asociación parece ser independiente del simporter Pi/H^+ . Mientras que para la salida del catión esta asociación sí involucra al simporter Pi/H^+ .

G. El eflujo de Ca^{2+} causado por la oxidación del β -hidroxibutirato en presencia de Pi, se previene con nigericina. En consecuencia, un mecanismo de regulación fundamental del eflujo de calcio, que posiblemente involucre el transporte de fosfato, es el que desempeña el antiport C^+/H^+ que en estos experimentos está mimetizado por el ionóforo carboxílico de tipo antiport, nigericina.

H. Tanto el influjo como el eflujo de Ca^{2+} poseen distintos mecanismos de regulación, por lo cual se propone la existencia de un translocador de Ca^{2+} de tipo canal.

I. El eflujo de Ca^{2+} de la mitocondria, causado por el β -hidroxibutirato + Pi, puede ser de primordial importancia en el control de reacciones metabólicas que requieran de calcio en el citoplasma celular.

BIBLIOGRAFIA

1. Estrada-O., S., de Céspedes, C. and Calderón, E. ACCUMULATION OF CALCIUM AND PHOSPHATE STIMULATED BY CARBOXYLIC ANTIBIOTICS INTO MITOCHONDRIA. *Bioenergetics* (1972) 3:361.
2. Romeo, D., Hinckley, A. and Rothfield, L. RECONSTITUTION OF A FUNCTIONAL MEMBRANE ENZYME SYSTEM IN A MONOMOLECULAR FILM. II FORMATION OF A FUNCTIONAL TERNARY FILM OF LIPO-POLYSACCHARIDE, PHOSPHOLIPID AND TRANSFERASE ENZYME. *J. Mol. Biol.* (1970) 53:491.
3. Davson, H. and Danielli, J.F. THE PERMEABILITY OF NATURAL MEMBRANES. 2nd. Ed. (1952) Cambridge University Press, Cambridge.
4. Benson, A. A. ON THE ORIENTATION OF LIPIDS IN CHLOROPLAST AND CELL MEMBRANES. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* (1966) 43:265.
5. Changeux, J. P., Thiery, J., Tung, Y. and Kittel, C. ON THE COOPERATIVITY OF BIOLOGICAL MEMBRANES. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1967) 57:335.
6. Horwitz, A. F., Michaelson, D. M. and Klein, M. P. MAGNETIC RESONANCE STUDIES OF MEMBRANE AND MODEL MEMBRANE SYSTEMS. *Biochim. Biophys. Acta* (1973) 298:1.
7. Branton, D. and Deamer, D. W. MEMBRANE STRUCTURE. (1972) p. 14 Springer Verlag, Wien. New York.
8. Singer, S. J. THE MOLECULAR ORGANIZATION OF BIOLOGICAL MEMBRANES. En: *Structure and Function of Biological Membranes*. (L. Rothfield, editor). (1971) p. 145. Academic Press, New York.

9. Singer, S. J. and Nicholson, G.L. THE FLUID MOSAIC MODEL OF THE STRUCTURE OF CELL MEMBRANES. *Science* (1972) 175:720.
10. Jost, P. C., Griffith, O. H., Capoldi, R. A. and Vanderkooi, G. EVIDENCE FOR BOUNDARY LIPID IN MEMBRANE. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1973) 70:480.
11. Menzel, H. M. and Hammes, G. G. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A LECITHIN-D(-)- β -HYDROXYBUTYRATE DEHYDROGENASE COMPLEX. *J. Biol. Chem.* (1973) 248:4885.
12. Cramer, W. A., Phillips, S. K. and Keenan, T. W. ON THE ROLE OF MEMBRANE PHASE IN THE TRANSMISSION MECHANISM OF COLICIN E1. *Biochem.* (1973) 12:1177.
13. Verkleij, A., J., Zwaal, R. F. A., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D. and van Deenen, L. L. M. THE ASSYMMETRIC DISTRIBUTION OF PHOSPHOLIPIDS IN THE HUMAN RED CELL MEMBRANE. A COMBINED STUDY USING PHOSPHOLIPASES AND FREEZE-ETCH ELECTRON MICROSCOPY. *Biochim. Biophys. Acta* (1973) 323:178.
14. Bretscher, M. S. SOME ASPECTS OF MEMBRANE STRUCTURE. En: *Perspectives in Membrane Biology.* (S. Estrada-O. y C. Gitler, editores) (1974) p. 3. Academic Press, New York.
15. Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T. and Wescott, W. C. RECONSTITUTION FOR CELL MEMBRANE STRUCTURE *in vitro* AND ITS TRANSFORMATION INTO EXCITABLE SYSTEM. *Nature* (1962) 194:979.
16. Parsegian, A. ENERGY OF AN ION CROSSING A LOW DIELECTRIC MEMBRANE : SOLUTIONS TO FOUR RELEVANT ELECTROSTATIC PROBLEMS. *Nature* (1969) 221:844.
17. Montal, M. EXPERIMENTAL MEMBRANES AND MECHANISMS OF BIO-ENERGY TRANSDUCTIONS. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* (1976) 5:119.

18. Werkheiser, W. C. and Bartley, W. THE STUDY OF STEADY-STATE CONCENTRATIONS OF INTERNAL SOLUTES OF MITOCHONDRIA BY RAPID CENTRIFUGAL TRANSFER TO A FIXATION MEDIUM. *Biochem. J.* (1957) 66:79.
19. Ptaff, E., Klingenberg, M., Ritt, E., Vogell, W. KORRELATION DES UNSPEZIFISCH PERMEABLEN MITOCHONDRIALEN RAUMES MIT DEM "INTERMEMBRAN-RAUM". *Eur. J. Biochem.* (1968) 5:222.
20. Parsons, D. F. and Yano, Y. THE CHOLESTEROL CONTENT OF THE OUTER AND INNER MEMBRANES OF GUINEA-PIG LIVER MITOCHONDRIA. *Biochim. Biophys. Acta* (1967) 135:362.
21. Lehninger, A. L. THE TRANSPORT SYSTEMS OF MITOCHONDRIAL MEMBRANES. En: *Biomembranes* (1971) Vol. 2, p. 147. Plenum Press, New York.
22. Racker, E. THE OXIDATION CHAIN AND THE TOPOGRAPHY OF THE INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE. En: *A New Look at Mechanisms in Bioenergetics.* (1976) p. 89. Academic Press, New York.
23. Eytan, G. D., Carroll, R. C. Schatz, G. and Racker, E. ARRANGEMENT OF THE SUBUNITS IN SOLUBILIZED AND MEMBRANE-BOUND CYTOCHROME c OXIDASE FROM BOVINE HEART. *J. Biol. Chem.* (1975) 250:8598.
24. Mitchell, P. PROTON-TRANSLOCATION PHOSPHORYLATION IN MITOCHONDRIA, CHLOROPLASTS AND BACTERIA: NATURAL FUEL CELLS AND SOLAR CELLS. *Fed. Proc.* (1967) 26:1370.
25. Ragan, C. I. and Hinkle, P. C. ION TRANSPORT AND RESPIRATORY CONTROL IN VESICLES FORMED FROM REDUCED NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE COENZYME Q REDUCTASE AND PHOSPHOLIPIDS. *J. Biol. Chem.* (1975) 250:8472.

26. Mitchell, P. and Moyle, J. ACID-BASE TITRATION ACROSS THE MEMBRANE SYSTEM OF RAT LIVER MITOCHONDRIA. *Biochem. J.* (1967) 104:588.
27. Mitchell, P. and Moyle, J. RESPIRATION DRIVEN PROTON TRANSLLOCATION IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. *Biochem. J.* (1967) 105: 1147.
28. Chappell, J. B. SYSTEMS USED FOR THE TRANSPORT OF SUBSTRATES INTO MITOCHONDRIA. *Br. Med. Bull.* (1968) 24:150.
29. Fonyó, A., Palmieri, F. and Quagliariello, E. CARRIER-MEDIATED TRANSPORT OF METABOLITES IN MITOCHONDRIA. En: *Horizons in Biochemistry and Biophysics.* (E. Quagliariello, F. Palmieri y T. Singer, editores) (1976). Vol. 2, p.60. Addison-Wesley Publishing Co., E.U.A.
30. Mitchell, P. CHEMIOSMOTIC COUPLING IN OXIDATIVE AND PHOTOSYNTHETIC PHOSPHORYLATION. *Glyn Research* (1966) p. 192. Bodmin, England.
31. Mitchell, P. COUPLING OF PHOSPHORYLATION TO ELECTRON AND HYDROGEN TRANSFER BY A CHEMIOSMOTIC TYPE OF MECHANISM. *Nature* (1961) 191:144.
32. Nicholls, D. G. THE INFLUENCE OF RESPIRATION AND ATP HYDROLYSIS ON THE PROTON-ELECTROCHEMICAL GRADIENT ACROSS THE INNER MEMBRANE OF RAT LIVER MITOCHONDRIA AS DETERMINATED BY ION DISTRIBUTION. *Eur. J. Biochem.* (1974) 50:305.
33. Padan, E. and Rottenberg, H. RESPIRATORY CONTROL AND THE PROTON ELECTROCHEMICAL GRADIENT IN MITOCHONDRIA. *Eur. J. Biochem.* (1973) 40:431.

34. Mitchell, P. PERFORMANCE AND CONSERVATION OF OSMOTIC WORK BY PROTON-COUPLED SOLUTE PORTER SYSTEMS. *J. Bioenergetics* (1973) 4:63.
35. Chappell, J. B. and Haarhoff, K. M. BIOCHEMISTRY OF MITOCHONDRIA (E. C. Slater, Z. Kaniuga y L. Wojtczak, editores) (1966). p. 75. Academic Press, New York.
36. Palmieri, F. and Klingenberg, M. DIRECT METHODS FOR MEASURING METABOLITE TRANSPORT AND DISTRIBUTION IN MITOCHONDRIA. En: *Methods in Enzymology* (S. Fleischer y L. Packer, editores) (1979). Vol. 56. Academic Press, New York.
37. Nohl, H. and Klingenberg, M. KINETICS OF ADP, ATP TRANSPORT IN MITOCHONDRIA AS STUDIED BY THE QUENCH-FLOW METHOD. *Biochim. Biophys. Acta* (1978) 503: 155.
38. Moore, C. and Pressman, B. C. MECHANISM OF ACTION OF VALINOMYCIN ON MITOCHONDRIA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1964) 15:562.
39. Pressman, B. C., Harris, E. J., Jagger, W. S. and Johnson, J. H. ANTIBIOTIC-MEDIATED TRANSPORT OF ALKALI IONS ACROSS LIPID BARRIERS. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1967) 58: 1949.
40. Graven, S. N., Estrada-O., S. and Lardy, H. A. ALKALI METAL CATION RELEASE AND RESPIRATORY INHIBITION INDUCED BY NIGERICIN IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1966) 56:654.
41. Mitchell, P. and Moyle, J. TRANSLOCATION OF SOME ANIONS CATIONS AND ACIDS IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. *Eur. J. Biochem.* (1969) 9:149.

42. Brand, M. D., Chung-Ho, C. and Lehninger, A. L. STOICHIOMETRY OF H^+ EJECTION DURING RESPIRATION-DEPENDENT ACCUMULATION OF Ca^{2+} BY RAT LIVER MITOCHONDRIA. J. Biol. Chem. (1976) 251:968.
43. Rottenberg, H. and Scarpa, A. CALCIUM UPTAKE AND MEMBRANE POTENTIAL IN MITOCHONDRIA. Biochem. (1974) 13:4811.
44. Moyle, J. and Mitchell, P. THE LANTHANIDE-SENSITIVE CALCIUM PHOSPHATE PORTER OF RAT LIVER MITOCHONDRIA. FEBS Lett. (1977) 2: 136.
45. Moyle, J. and Mitchell, P. LANTHANIDE-SENSITIVE CALCIUM-MONOCARBOXYLATE SYMPORT IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. FEBS Lett. (1977) 84:135.
46. Lehninger, A. L. ESTERIFICATION OF INORGANIC PHOSPHATE COUPLED TO ELECTRON TRANSPORT BETWEEN DIHYDRODIPHOSPHOPYRIDINE NUCLEOTIDE AND OXYGEN. J. Biol. Chem. (1949) 178: 625.
47. Siekevitz, P. and Potter, V. R. BIOCHEMICAL STRUCTURE OF MITOCHONDRIA. I. INTRAMITOCHONDRIAL COMPONENTS AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION. J. Biol. Chem. (1955) 215:221.
48. De Luca, H. F. and Engstrom, G. W. CALCIUM UPTAKE BY RAT KIDNEY MITOCHONDRIA. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1961) 47:1744.
49. Vasington, F. D. and Murphy, J. V. Ca^{++} UPTAKE BY RAT KIDNEY MITOCHONDRIA AND ITS DEPENDENCE ON RESPIRATION AND PHOSPHORYLATION. J. Biol. Chem. (1962) 237:2670.

50. Brierley, G., Murer, E. and Bachmann, E. STUDIES ON ION TRANSPORT. V. RESTORATION OF THE ADENOSINE TRIPHOSPHATE-SUPPORTED ACCUMULATION OF Ca^{++} IN AGED HEART MITOCHONDRIA. J. Biol. Chem. (1964) 239:2706.
51. Chance, B. THE ENERGY-LINKED REACTION OF CALCIUM WITH MITOCHONDRIA. J. Biol. Chem. (1965) 240:2729.
52. Mitchell, P. and Moyle, J. ESTIMATION OF MEMBRANE POTENTIAL AND pH DIFFERENCE ACROSS THE CRISTAE MEMBRANE OF RAT LIVER MITOCHONDRIA. Eur. J. Biochem. (1969) 7:471.
53. Vasington, F. D. and Murphy, J. V. ACTIVE BINDING OF CALCIUM BY MITOCHONDRIA. Fed. Proc. (1961) 20:146.
54. Rossi, C. S. and Lehninger, A. L. STOICHIOMETRIC RELATIONSHIPS BETWEEN ACCUMULATION OF IONS BY MITOCHONDRIA AND THE ENERGY-COUPPLING SITES IN THE RESPIRATORY CHAIN. Biochem. Z. (1963) 338:698.
55. Ulrich, F. THE ACTIVATION OF MITOCHONDRIAL ADENOSINE TRIPHOSPHATASE BY CALCIUM. Biochim. Biophys. Acta (1965) 105:460.
56. Rossi, C. S. and Lehninger, A. L. STOICHIOMETRY OF RESPIRATORY STIMULATION, ACCUMULATION OF Ca^{++} AND PHOSPHATE, AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. J. Biol. Chem. (1964) 239:3971.
57. Chance, B. CONTROLLED STATES IN MITOCHONDRIA-STATE 6. Fed. Proc. (1964) 23:265.
58. Bielawski, J. and Lehninger, A. L. RELATIONSHIPS IN MITOCHONDRIAL ACCUMULATION OF CALCIUM AND PHOSPHATE SUPPORTED BY HYDROLYSIS OF ADENOSINE TRIPHOSPHATE. J. Biol. Chem. (1966) 241:4316.

59. Drahota, Z., Carafoli, E., Rossi, C. S., Gamble, R. L. and Lehninger, A. L. THE STEADY STATE MAINTENANCE OF ACCUMULATED Ca^{++} IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. *J. Biol. Chem.* (1965) 240:2712.
60. Rossi, C. S., Bielawski, J., Carafoli, E. and Lehninger, A.L. THE RELATIONSHIP OF THE Ca^{++} EFFLUX RATE TO THE "SUPER-STOICHIOMETRY" OF RESPIRATION-LINKED Ca^{++} ACCUMULATION BY MITOCHONDRIA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*(1966) 22:206.
61. Drahota, Z. and Lehninger, A. L. MOVEMENTS OF H^+ , K^+ AND Na^+ DURING ENERGY-DEPENDENT UPTAKE AND RETENTION OF Ca^{++} IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*(1965) 19:351.
62. Chappell, J. B. and Crofts, A. R. ACCUMULATION AND VOLUME CHANGES OF ISOLATED LIVER MITOCHONDRIA. *Biochem. J.*(1965) 95:378.
63. Crofts, A. R. and Chappell, J. B. CALCIUM ION ACCUMULATION AND VOLUME CHANGES OF ISOLATED LIVER MITOCHONDRIA. *Biochem. J.* (1965) 95:387.
64. Rasmussen, H., Chance, B. and Ogata, E. A MECHANISM FOR THE REACTIONS OF CALCIUM WITH MITOCHONDRIA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* (1965) 53:1069.
65. Mitchell, P. and Moyle, J. STOICHIOMETRY OF PROTON TRANSLOCATION THROUGH THE RESPIRATORY CHAIN AND ADENOSINE TRIPHOSPHATASE SYSTEMS OF RAT LIVER MITOCHONDRIA. *Nature* (1965) 208:147.
66. Mitchell, P. and Moyle, J. EVIDENCE DISCRIMINATING BETWEEN THE CHEMICAL AND THE CHEMIOSMOTIC MECHANISMS OF ELECTRON TRANSPORT PHOSPHORYLATION. *Nature* (1965) 208:1205.
67. Rossi, C. S., Bielawski, J. and Lehninger, A. L. SEPARATION OF

- H⁺ AND OH⁻ IN THE EXTRAMITOCHONDRIAL AND MITOCHONDRIAL PHASES DURING Ca⁺⁺-ACTIVATED ELECTRON TRANSPORT. J. Biol. Chem. (1966) 241:1919.
68. Carafoli, E., Rossi, C. S. and Lehninger, A. L. UPTAKE OF ADENINE NUCLEOTIDES BY RESPIRING MITOCHONDRIA DURING ACTIVE ACCUMULATION OF Ca⁺⁺ AND PHOSPHATE. J. Biol. Chem. (1965) 240:2254.
69. Carafoli, E., Gamble, R. L. and Lehninger, A. L. ON THE MAXIMUM STOICHIOMETRY OF ENERGY-LINKED Ca⁺⁺ ACCUMULATION DURING ELECTRON TRANSPORT IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1965) 21:215.
70. Mela, L. AGENTS AFFECTING DIVALENT ION INTERACTION WITH MITOCHONDRIAL MEMBRANES. Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol. (1967) 26:456.
71. Mela, L. INTERACTIONS OF La³⁺ AND LOCAL ANESTHETIC DRUGS WITH MITOCHONDRIAL Ca⁺⁺ and Mn⁺⁺ UPTAKE. Arch. Biochem. Biophys. (1968) 123:286.
72. Mela, L. La⁺⁺⁺ AS A SPECIFIC INHIBITOR OF DIVALENT CATION-INDUCED MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSFER. Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol. (1968) 27:828.
73. Scarpa, A. and Azzone, G. F. THE MECHANISM OF ION TRANSLOCATION IN MITOCHONDRIA. 4. COUPLING OF K⁺ EFFLUX WITH Ca²⁺ UPTAKE. Eur. J. Biochem. (1970) 12: 528.
74. Vainio, H., Mela, L. and Chance, B. ENERGY DEPENDENT DIVALENT CATION TRANSLOCATION IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. Eur. J. Biochem. (1970) 12:387.

75. Reed, K. C. and Bygrave, F. L. ACCUMULATION OF LANTHANUM BY RAT LIVER MITOCHONDRIA. *Biochem. J.* (1974) 138:239.
76. Moore, C. L. SPECIFIC INHIBITION OF MITOCHONDRIAL Ca^{++} TRANSPORT BY RUTHENIUM RED. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1971) 42:298.
77. Vasington, F. D., Gazzotti, P., Tiozzo, R. and Carafoli, E. THE EFFECT OF RUTHENIUM RED ON Ca^{++} TRANSPORT AND RESPIRATION IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. *Biochim. Biophys. Acta* (1972) 256:43.
78. Rossi, C. S., Vasington, F. D. and Carafoli, E. THE EFFECT OF RUTHENIUM RED ON THE UPTAKE AND RELEASE OF Ca^{++} BY MITOCHONDRIA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1973) 50:846.
79. Reed, K. C. and Bygrave, F. L. A KINETIC STUDY OF MITOCHONDRIAL CALCIUM TRANSPORT. *Eur. J. Biochem.* (1975) 55:497.
80. Carafoli, E. ACTIVE ACCUMULATION OF Sr^{2+} BY RAT-LIVER MITOCHONDRIA. II. COMPETITION BETWEEN Ca^{2+} AND Sr^{2+} . *Biochim. Biophys. Acta* (1965) 97:99.
81. Carafoli, E. ACTIVE ACCUMULATION OF Sr^{2+} BY RAT-LIVER MITOCHONDRIA. III. STIMULATION OF RESPIRATION BY Sr^{2+} AND ITS STOICHIOMETRY. *Biochim. Biophys. Acta* (1965) 97:107.
82. Selwyn, M. J., Dawson, A. P. and Dunnett, S. J. CALCIUM TRANSPORT IN MITOCHONDRIA. *FEBS Lett.* (1970) 10:1.
83. Chance, B. and Mela, L. CALCIUM AND MANGANESE INTERACTIONS IN MITOCHONDRIAL ION ACCUMULATION. *Biochem.* (1966) 5:3220.
84. Carafoli, E. and Lehninger, A. L. A SURVEY OF THE INTERACTION OF CALCIUM IONS WITH MITOCHONDRIA FROM DIFFERENT TISSUES AND SPECIES. *Biochem. J.* (1971) 122:681.

85. Reed, K. C. and Bygrave, F. L. A RE-EVALUATION OF ENERGY INDEPENDENT CALCIUM-ION BINDING BY RAT LIVER MITOCHONDRIA. *Biochem. J.* (1974) 142:555.
86. Sandri, G., Panfili, E. and Sottocasa, G. L. THE CALCIUM-BINDING GLYCOPROTEIN AND MITOCHONDRIAL CALCIUM MOVEMENTS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1976) 68:1272.
87. Gómez-Puyoum A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Becker, G. and Lehninger, A. L. AN INSOLUBLE Ca^{2+} -BINDING FACTOR FROM RAT LIVER MITOCHONDRIA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1972) 47:814.
88. Prestipino, G., Ceccarelli, D., Conti, F. and Carafoli, E. INTERACTIONS OF A MITOCHONDRIAL Ca^{2+} -BINDING GLYCOPROTEIN WITH LIPID BILAYER MEMBRANES. *FEBS Lett.* (1974) 45:99.
89. Shamoo, A. E. and Jeng, A. Y. POSSIBLE CALCIUM CARRIER FROM THE INNER MEMBRANE OF CALF HEART MITOCHONDRIA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1978) 307:235.
90. Heaton, G. M. and Nicholls, D. G. THE CALCIUM CONDUCTANCE OF THE INNER MEMBRANE OF RAT LIVER MITOCHONDRIA AND THE DETERMINATION OF THE CALCIUM ELECTROCHEMICAL GRADIENT. *Biochem. J.* (1976) 156:635.
91. Fiskum, G. Reynafarje, B. and Lehninger, A. L. THE ELECTRIC CHARGE STOICHIOMETRY OF RESPIRATION-DEPENDENT Ca^{2+} UPTAKE BY MITOCHONDRIA. *J. Biol. Chem.* (1979) 254:6288.
92. Lehninger, A. L. ROLE OF PHOSPHATE AND OTHER PROTON-DONATING ANIONS IN RESPIRATION-COUPLED TRANSPORT OF Ca^{2+} BY MITOCHONDRIA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* (1974) 71:1520.

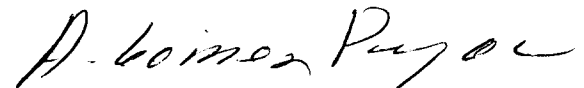
93. Crompton, M. and Heid, I. THE CYCLING OF CALCIUM, SODIUM AND PROTONS ACROSS THE INNER MEMBRANE OF CARDIAC MITOCHONDRIA. Eur. J. Biochem. (1978) 91:599.
94. Moyle, J. and Mitchell, P. ELECTRIC CHARGE STOICHIOMETRY OF CALCIUM TRANSLOCATION IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. FEBS Lett. (1977) 73:131.
95. Harris, E. J. ANION/CALCIUM ION RATIOS AND PROTON PRODUCTION IN SOME MITOCHONDRIAL CALCIUM ION UPTAKES. Biochem. J. (1978) 176:913.
96. Fiskum, G. and Lehninger, A. L. REGULATED RELEASE OF Ca^{2+} FROM RESPIRING MITOCHONDRIA BY $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ ANTIPORT. J. Biol. Chem. (1979) 254:6236.
97. Crompton, M., Hediger, M. and Carafoli, E. THE EFFECT OF INORGANIC PHOSPHATE ON CALCIUM INFLUX INTO RAT HEART MITOCHONDRIA. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1978) 80:540
98. Lotscher, H. R., Schwerzmann, K. and Carafoli, E. THE TRANSPORT OF Ca^{2+} IN A PURIFIED POPULATION OF INSIDE OUT VESICLES FROM RAT LIVER MITOCHONDRIA. FEBS Lett. (1979) 99:194.
99. Wehrle, J. P. and Pedersen, P. L. PHOSPHATE TRANSPORT IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. PROPERTIES OF A Ca^{2+} ACTIVATED UPTAKE PROCESS IN INVERTED INNER MEMBRANE VESICLES. J. Biol. Chem. (1979) 254:7269.
100. Lehninger, A. L., Vercesi, A. and Bababunmi, E. A. REGULATION OF Ca^{2+} RELEASE FROM MITOCHONDRIA BY THE OXIDATION-REDUCTION STATE OF PYRIDIN NUCLEOTIDES. Proc. Nat. Acad. Sci. (1978) 75:1690.
101. Crompton, M. and Carafoli, E. THE SODIUM-INDUCED EFFLUX OF

- CALCIUM FROM HEART MITOCHONDRIA. A POSSIBLE MECHANISM FOR THE REGULATION OF MITOCHONDRIAL CALCIUM. Eur. J. Biochem. (1976) 69:453.
102. Crompton, M., Moser, R., Ludi, H. and Carafoli, E. THE INTERRELATIONS BETWEEN THE TRANSPORT OF SODIUM AND CALCIUM IN MITOCHONDRIA OF VARIOUS MAMMALIAN TISSUES. Eur. J. Biochem. (1978) 82:25.
103. Roman, I., Gmaj, P., Nowicka, C. and Angielski, S. REGULATION OF Ca^{2+} EFFLUX FROM KIDNEY AND LIVER MITOCHONDRIA BY UNSATURATED FATTY ACIDS AND Na^+ IONS. Eur. J. Biochem. (1979) 102:615.
104. Fiskum, G. and Cockrell, R. S. RUTHENIUM RED SENSITIVE AND INSENSITIVE CALCIUM TRANSPORT IN RAT LIVER AND EHRLICH ASCITES TUMOR CELL MITOCHONDRIA. FEBS Lett. (1978) 92:125.
105. Bernardi, P. and Azzone, G. F. ΔpH INDUCED CALCIUM FLUXES IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. Eur. J. Biochem. (1979) 102:555.
106. Fiskum, G., Greif, R., Vercesi, A. and Lehninger, A. L. THE BIOENERGETICS OF MITOCHONDRIAL Ca^{2+} EFFLUX AND STIMULATION BY TRIIODOTHYRONINE (T_3). Fed. Proc. (1980) 39:1706.
107. Caroni, P., Schwerzmann, K. and Carafoli, E. SEPARATE PATHWAYS FOR Ca^{2+} UPTAKE AND RELEASE IN LIVER MITOCHONDRIA. FEBS Lett. (1978) 96:339.
108. Bragadin, M., Pozzan, T. and Azzone, G. F. ACTIVATION ENERGIES AND ENTHALPIES DURING Ca^{2+} TRANSPORT IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. FEBS Lett. (1979) 104:347.
109. Johnson, D. and Lardy, H. A. ISOLATION OF LIVER OR KIDNEY

- MITOCHONDRIA. En: Methods in Enzymology. (R. W. Estabrook y M. E. Pullman, editores) (1967). Vol. 10, p.94. Academic Press, New York.
110. Estrada-O., S. and Calderón, E. POTASSIUM AND PROTON MOVEMENTS IN RELATION TO THE ENERGY LINKED TRANSPORT OF PHOSPHATE IN LIVER MITOCHONDRIA. *Biochem.* (1970) 9:2092.
 111. Jacobs, E. E., Jacobs, M., Sanadi, D. R. and Bradley, L. B. UNCOUPLING OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION BY CADMIUM IONS. *J. Biol. Chem.* (1956) 223:147.
 112. Lehninger, A. L. and Carafoli, E. ENERGY-LINKED TRANSPORT OF Ca^{++} , PHOSPHATE AND ADENINE NUCLEOTIDES. En: Methods in Enzymology. (R. W. Estabrook y M. E. Pullman, editores) (1967). Vol. 10, p. 745. Academic Press, New York.
 113. Johnson, J. H. and Pressman, B. C. CONTINUOUS RECORDING OF pH and pCa DURING CALCIUM BINDING BY MUSCLE MICROSOMES. *Biochim. Biophys. Acta* (1968) 153:500.
 114. Madeira, V. M. C. A RAPID AND ULTRASENSITIVE METHOD TO MEASURE Ca^{++} MOVEMENTS ACROSS BIOLOGICAL MEMBRANES. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1975) 64:870.
 115. Flora, V., Gennaro, R. and Romeo, D. IMPROVED TECHNIQUE FOR THE MEASUREMENT OF THE KINETICS OF Ca^{2+} UPTAKE BY CELLS: THE COUPLING OF AN AMPLIFIER WITH VOLTAGE REGULATOR TO A Ca^{2+} -SELECTIVE ELECTRODE. *Anal. Biochem.* (1980) 102:77.
 116. Caswell, A. H. and Hutchison, J. D. VISUALIZATION OF MEMBRANE BOUND CATIONS BY A FLUORESCENT TECHNIQUE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1971) 42:43.
 117. Fabiato, A. and Fabiato, F. USE OF CHLOROTETRACYCLINE FLUORESCENCE TO DEMONSTRATE Ca^{2+} FROM SARCOPLASMIC RETICULUM OF SKINNED CARDIAC CELLS. *Nature* (1979) 281:146.

EL JURADO DESIGNADO POR EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
DE LA SALUD DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA, APROBO ESTA TESIS EL DÍA 23 DE SEPTIEMBRE
DE 1980.


DR. SERGIO ESTRADA ORIHUELA


DR. ARMANDO GOMEZ PUYOU


DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ